



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΩΤΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ**

**Λειτουργικός ρόλος της μιτωτικής κινάσης Haspin στα εμβρυονικά
βλαστικά κύτταρα και τους γαμέτες**

ΘΕΟΦΑΝΗ ΚΙΟΣΣΕ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΤΩΤΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ**

**Λειτουργικός ρόλος της μιτωτικής κινάσης Haspin στα εμβρυονικά
βλαστικά κύτταρα και τους γαμέτες**

ΘΕΟΦΑΝΗ ΚΙΟΣΣΕ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Ημερομηνία αίτησης της κ. Κιοσσέ Θεοφανής: 6-10-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 771^α/28-11-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργάτος Σπυρίδων, Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Πολίτου Αναστασία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 22-12-2014

«Ο ρόλος των μιτωτικών κινασών στην ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση. Λειτουργικός ρόλος της μιτωτικής κίνησης Haspin στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και τους γαμέτες»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 906^α/25-11-2019

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σοφικίτης Νικόλαος	Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττας Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-7-2020

Ιωάννινα 27-8-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην οικογένειά μου
που με έμαθε ποτέ να μη το βάζω κάτω
και στον Κώστα μου,
που είναι το άλλο μου μισό

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας (ΙΤΕ)- Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Σ. Γεωργάτου, κατά το χρονικό διάστημα 2014-2020.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεωργάτο, γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη Διδακτορική μου Διατριβή, παρόλο που το γνωστικό μου αντικείμενο ήταν πολύ διαφορετικό από αυτό της Μοριακής Βιολογίας. Όλα αυτά τα χρόνια είναι δίπλα μου και με καθοδηγεί. Τον ευχαριστώ επίσης για τις αμέτρητες διαφωνίες και γιατί πάντα επέτρεπε τις πρωτοβουλίες που έπαιρνα κατά τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού αυτής της διατριβής.

Η κυρία Αναστασία Πολίτου είναι ο βράχος του εργαστηρίου. Οι γνώσεις και η εμπειρία της συνέβαλλαν σε μεγάλο βαθμό στην ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς. Την ευχαριστώ επίσης για τις καίριες παρεμβάσεις και γιατί το εργαστήριο Βιολογικής Χημείας είναι το δεύτερο σπίτι μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Π. Κούκλη και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, γιατί δέχτηκαν να αξιολογήσουν αυτή τη διατριβή. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Α. Μπατιστάτου και την κ. Ζ. Ευαγγέλου για το χρόνο που αφιέρωσαν στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας.

Ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου (και στην Διατριβή μου) κατέχει η Δρ. Κ. Σουψανά. Χωρίς εσένα όλο αυτό θα ήταν απλά ένα όνειρο. Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Μ. Μπότου αλλά και στην οικογένεια μου που μου δίδαξε την αξία της εργατικότητας και της επιμονής και γιατί είναι πάντα δίπλα μου.

Τέλος θα πρέπει να ευχαριστήσω τα πρώτα μου «πειραματόζωα», τον Ευθύμη και την Άρτεμις. Την κ. Α. Χριστογιάννη για τη συμβολή της κατά τις ατελείωτες ώρες των βιοχημικών πειραμάτων, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου μας.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	9
1.1 Πυρήνας: Μορφολογία, δομή και λειτουργία	11
1.2 Η δομή και η οργάνωση της χρωματίνης	12
1.3 Το νουκλεόσωμα	12
1.4 Οι ισομορφές των ιστονών	14
1.5 Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ο ρόλος τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	16
1.6 Η προστασία της συνοχής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων	20
1.7 Το <i>chromosomal passenger complex (CPC)</i> κατευθύνει την πορεία των μιτωτικών διαιρέσεων	22
1.8 Η μιτωτική κινάση <i>Haspin</i> κωδικοποιείται από το γονίδιο <i>GSG2</i>	24
1.8.1. Η <i>Haspin</i> στον άνθρωπο και το ποντίκι	26
1.8.2. Η δομή του υποκινητή του <i>GSG2</i>	26
1.8.3. Δομικά χαρακτηριστικά και συντηρημένα μοτίβα της πρωτεΐνης	28
1.8.4. Η <i>Haspin</i> φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 3 της ιστόνης H3	30
1.8.5. Η <i>Haspin</i> απενεργοποιείται από τη φωσφατάση PP1γ και τη ρυθμιστική υπομονάδα RepoMan	32
1.8.6. Η <i>Haspin</i> ρυθμίζει την προσέλκυση του CPC (<i>chromosomal passenger complex</i>) στα κεντρομερίδια	33
1.8.7. Η <i>Haspin</i> είναι υπεύθυνη για την κεντρομεριδιακή συνοχή και την προστασία των αδελφών χρωματίδων από πρόωρη απελευθέρωση	37
1.8.8. Η <i>Haspin</i> στα φυτά	42
1.8.9. Η <i>Haspin</i> στα ωκύτταρα	44
1.9. Η σπερματογένεση στο ποντίκι είναι μια στενά ελεγχόμενη διαδικασία	45
1.9.1. Ο κύκλος του σπερματοφόρου επιθηλίου στο ποντίκι	47
1.9.2. Οι μειωτικές διαιρέσεις των σπερματοκυττάρων	51
1.9.3. Η πρόφαση της μείωσης I	52

1.9.4	Το CPC συμμετέχει στη μειωτική διαίρεση I και II των σπερματοκυττάρων.	54
	1.10 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	57
	2. Υλικά και Μέθοδοι	59
	2.1 Μορφολογικές μέθοδοι	61
2.1.1.	Έμμεσος ανοσοφθορισμός κυττάρων	61
2.1.2.	Λήψη ιστών από ποντικούς CD-1 αγρίου τύπου	62
2.1.3.	Παρασκευή τομών κρουστάτη	62
2.1.4.	Έμμεσος ανοσοφθορισμός τομών κρουστάτη	62
2.1.5.	Επισκόπηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο	63
2.1.6.	Ταυτοποίηση σταδίων ανάπτυξης σπερματοφόρων σωληναρίων σε όρχεις και ωθήκες ποντικού από τομές κρουστάτη	63
	2.2 Βιοχημικές μέθοδοι	64
2.2.1.	Απομόνωση πυρήνων από ιστό όρχεως ποντικού	64
2.2.2.	Απομόνωση ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ποντικού	64
2.2.2.1	Απομόνωση ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ποντικού με χρήση 0,5N HCl	64
2.2.3.	Κατακρήμιση ιστονών	65
2.2.3.1.	Κατακρήμιση ιστονών με ακετόνη	65
2.2.3.2.	Κατακρήμιση ιστονών με τριχλωροξικό οξύ (TCA)	65
2.2.4.	Ανοσοκατακρήμιση ιστονών από ιστό όρχεως ποντικού με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G	65
	2.3. Δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής	67
	2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	68
2.4.1.	Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου	68
	2.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	68
	2.6. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή	69
	3. Αποτελέσματα	71

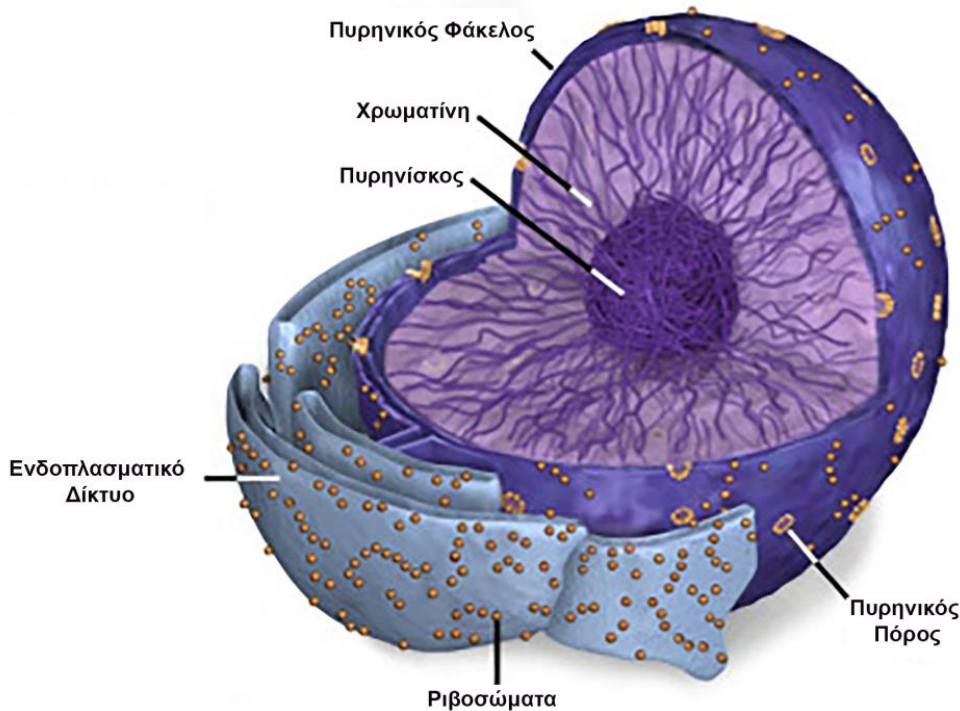
3.1. Ανάλυση μεταγραφώματος βλαστικών κυττάρων ποντικού, στα οποία έχει υπερεκφραστεί ή απαλειφθεί το γονίδιο της <i>Haspin</i>	73
3.2. Ταυτοποίηση των σταδίων του σπερματοφόρου επιθηλίου στο ποντίκι	76
3.2.1. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων I-IV	76
3.2.2. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων V-VIII(1 ^ο μισό)	77
3.2.3. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων VIII(2 ^ο μισό)-X	78
3.2.4. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων XI-XII	79
3.3. Οι μιτωτικές διαιρέσεις των σπερματογονίων και οι μειωτικές διαιρέσεις των σπερματοκυττάρων	80
3.3.1. Η τροποποίηση H3T3rh που καταλύεται από την κινάση <i>Haspin</i> είναι παρούσα σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια	80
3.3.2. Η τριπλή τροποποίηση PMM (H3T3rhK4me ₃ R8me ₂) εντοπίζεται σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια	83
3.3.3. Οι τροποποιήσεις H3T3rh και PMM συμμετέχουν στις δύο μειωτικές διαιρέσεις	85
3.4. Οι μετα-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες	88
3.4.1. Η H3T3rh ανιχνεύεται σε στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες, αλλά όχι σε ώριμες	90
3.4.2. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής αναστολής επιβεβαιώνει την ειδικότητα του αντισώματος	89
3.4.3. Η PMM-υπογραφή (H3T3rhK4me ₃ R8me ₂) ανιχνεύει επίτοπους σε πολύ πρώιμες (βήματα 4-7), σε πρώιμες (βήματα 8-10), αλλά όχι ώριμες σπερματίδες (βήματα 11-16)	90
3.4.4. Οι δύο μεθυλιώσεις (H3K4me ₃ -H3R8me ₂) εγκαθιδρύονται νωρίτερα από την φωσφορυλίωση (H3T3rh), η οποία ολοκληρώνει την PMM-υπογραφή	91
3.4.5. Διαδικοί συνδυασμοί του μοτίβου H3T3rhK4me ₃ R8me ₂ εμφανίζονται διαδοχικά κατά την διάρκεια της σπερμιογένεσης	93
3.4.5.1. Οι συνδυασμοί του μοτίβου PMM στις όψιμες στρογγυλές και τις επιμηκυνόμενες σπερματίδες βήματος 8-10	94
3.4.5.2. Το H3T3rhK4me ₃ -τροποποιημένο πεπτιδίο έχει υψηλή συγγενεία για το aPMM αντίσωμα	95
3.4.6. Οι τροποποιήσεις H3T3rh και PMM καταλαμβάνουν συγκεκριμένη θέση στην χρωματίνη των συμπυκνωμένων απλοειδών σπερματίδων	97

3.4.7. Τα ειδικά για τη σπερματογένεση Scml2 και Dazl, των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται απουσία της Haspin, συνυπάρχουν με την H3T3rh στις όψιμες στρογγυλές και επιμηκνόμενες απλοειδείς σπερματίδες σωληναρίων σταδίου VIII-X	102
3.5. Η Haspin ως ρυθμιστής της σπερματογένεσης	105
3.5.1. Τα εκχυλίσματα ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ενήλικου ποντικού φέρουν τις τροποποιήσεις H3T3rh, H3T3rhK4me ₃ R8me ₂ και H3K4me ₃ R8me ₂	105
3.5.2. Τα κύτταρα του όρχεως είναι δυνατόν να φέρουν υποπληθυσμούς νουκλεοσωμάτων με εναλλαγές τροποποιήσεων φωσφορλίωσης-μεθυλίωσης, στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3	108
4. Συζήτηση	111
4.1. Η ταυτοποίηση των σταδίων ανάπτυξης του επιθηλίου του όρχεως με από τη χρήση τομών κρουστάτη	113
4.2. Η παρουσία της Haspin στη σπερματογένεση	115
4.2.1. Τα μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια	116
4.2.2. Τα μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα	117
4.2.3. Οι μετα-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες	119
4.3. Η σημασία της κατανομής τροποποιήσεων του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης H3 σε ευχρωματινικές και ετεροχρωματινικές περιοχές των απλοειδών σπερματίδων	120
4.3.1. Ο ρόλος των H3T3rh και PMM στις απλοειδείς σπερματίδες	122
4.4. Η Haspin ως επιγενετικός ρυθμιστής της σπερματογένεσης	123
5. Συμπεράσματα	127
6. Περιλήψεις	131
<i>Περίληψη στα ελληνικά</i>	133
<i>Abstract</i>	135
Βιβλιογραφία	137

1. Εισαγωγή

1.1 Πυρήνας: Μορφολογία, δομή και λειτουργία

Ο πυρήνας είναι το κυτταρικό οργανίδιο που διακρίνει τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς από τους προκαρυωτικούς. Η πιο χαρακτηριστική δομή του είναι οι δύο ομόκεντρες μεμβράνες (εσωτερική και εξωτερική) που συνιστούν τον πυρηνικό φάκελο. Στο εσωτερικό τους, περικλείουν τη χρωματίνη, ενώ η επικοινωνία με το κυτταρόπλασμα γίνεται μέσω των πυρηνικών πόρων (εικ. 1). Η εξωτερική πυρηνική μεμβράνη αποτελεί συνέχεια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η εσωτερική επενδύεται από τη λάμινα. Η τελευταία είναι ένα εκτεταμένο δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων που προσδίδει μηχανική σταθερότητα, συμμετέχει στην αγκυροβολήση του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων και στην οργάνωση της χρωματίνης^(1, 2).



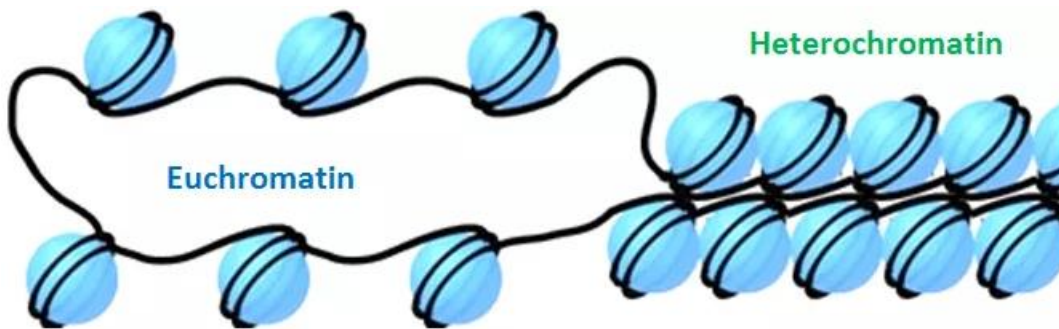
Εικόνα 1. Η μορφολογία του πυρήνα. Εικόνα τροποποιημένη από <https://micro.magnet.fsu.edu>.

Η σημασία του πυρήνα έγκειται στη διατήρηση της γενετικής πληροφορίας (αντιγραφή, επιδιόρθωση κτλ), στη διαχείριση μεταγραφικών παραγόντων για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και την επεξεργασία του RNA⁽³⁾.

Το σχήμα του πυρήνα σχετίζεται άμεσα με το είδος και τη λειτουργία του κυττάρου. Στον άνθρωπο για παράδειγμα συναντώνται υπερμεγέθεις πυρήνες στα μακροφάγα του ανοσοποιητικού συστήματος και υπερ-συμπυκνωμένοι στα σπερματοζώαρια του αναπαραγωγικού⁽⁴⁾.

1.2 Η δομή και η οργάνωση της χρωματίνης.

Χρωματίνη αποκαλείται το σύμπλοκο του DNA με τις πρωτεΐνες. Η λιγότερο συμπυκνωμένη και μεταγραφικά ενεργή μορφή ονομάζεται ευχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη είναι περισσότερο συμπυκνωμένη και μεταγραφικά ανενεργή δομή (εικ. 2).



Εικόνα 2. Ο διαχωρισμός της χρωματίνης σε ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη (<https://vivadifferences.com/euchromatin-vs-heterochromatin/>).

Η ετεροχρωματίνη διακρίνεται σε δυο υποκατηγορίες: τη συστατική (constitutive) και την περιστασιακή (facultative). Η πρώτη περιέχει δορυφορικό DNA, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και μεταθετά στοιχεία, παραμένει συμπυκνωμένη σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και είναι μεταγραφικά ανενεργή. Συναντάται στα κεντρομερίδια και τα τελομερή των κυττάρων. Η δεύτερη αποτελεί μια πιο δυναμική δομή, αφού μπορεί να μετασχηματιστεί σε ευχρωματίνη, ως απόκριση σε κυτταρικά σήματα. Συνήθως περιέχει γενετικές πληροφορίες που θα μεταγραφούν κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων^(5, 6).

1.3 Το νουκλεόσωμα

Η στοιχειώδης μονάδα δομικής οργάνωσης της χρωματίνης ονομάζεται νουκλεόσωμα. Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος απαρτίζεται από ένα οκταμερές ιστονών, γύρω από το οποίο περιελίσσεται DNA μήκους 146bp σε 1,67 στροφές. Το οκταμερές αποτελείται από δυο ζεύγη των 4 βασικών ιστονών. Οι H3 και H4 σχηματίζουν ένα τετραμερές σύμπλοκο που βρίσκεται στο κέντρο της δομής, ενώ οι H2A και H2B σχηματίζουν δυο διμερή, τα οποία εντοπίζονται στα άκρα (εικ. 3). Τα γειτονικά νουκλεοσώματα ενώνονται μεταξύ τους με ποικίλου μήκους συνδετικό DNA⁽⁷⁾.



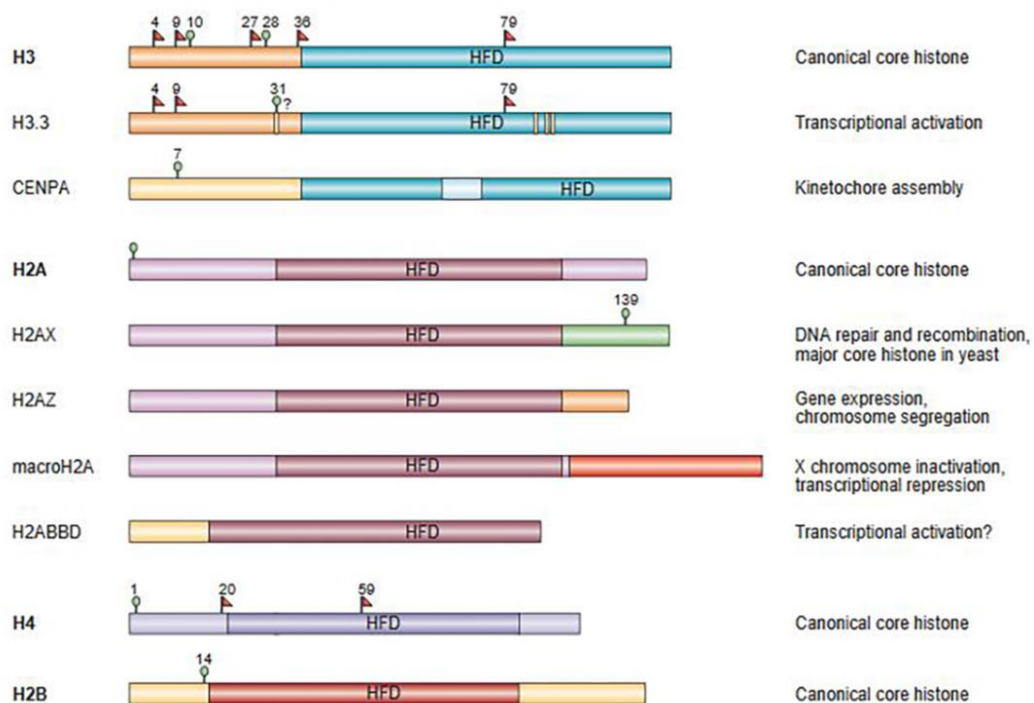
Εικόνα 3. Η κρυσταλλική δομή του νουκλεοσώματος. H3: μπλέ, H4: πράσινο, H2A: κίτρινο, H2B: κόκκινο⁽⁷⁾.

Οι ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4 είναι εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αποτελούνται από ένα βασικό άμινο-τελικό άκρο και ένα καρβόξυ-τελικό τμήμα που σχηματίζει το λεγόμενο “histone fold domain”. Αυτό είναι υπεύθυνο για τον ετεροδιμερισμό μεταξύ των ιστονών και την περιέλιξη του DNA γύρω από το βασικό πυρήνα του νουκλεοσώματος⁽⁸⁾. Το histone fold domain απαρτίζεται από 3 α-έλικες ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) και 2 βρόχους (L1, L2). Η διαδικασία του διμερισμού συμπεριλαμβάνει την ευθυγράμμιση του L1 της μίας ιστόνης, με τον L2 της δεύτερης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται μια δευτεροταγής δομή που ονομάζεται “handshake motif”. Τα διμερή H3-H4 συνδέονται μεταξύ τους μέσω στέreo-συμπληρωματικότητας (four helix bundle formation). Το διμερές H2A-H2B ενώνεται με το τετραμερές H3-H4 μέσω του handshake motif και μέσω μιας περιοχής της H2A που ονομάζεται “docking domain”. Το άμινο-τελικό άκρο των ιστονών υπόκειται σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ. ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση κ.α.) και είναι ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης⁽⁹⁻¹¹⁾.

Η συνδετική ιστόνη H1 συνδέεται στο νουκλεόσωμα στο σημείο εισόδου και εξόδου του DNA. Συμβάλλει στη διασύνδεση διπλανών νουκλεοσωμάτων και προωθεί τη συμπύκνωση της χρωματίνης στην ίνα των 30nm⁽¹²⁾.

1.4 Οι ισομορφές των ιστονών

Ως ισομορφές των ιστονών ορίζονται οι πρωτεΐνες που αντικαθιστούν τις κανονικές H2A, H2B, H3 και H4 στα νουκλεοσώματα των ευκαρυωτικών οργανισμών και φέρουν ειδικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά (εικ. 4). Οι κανονικές ισομορφές των ιστονών εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της S φάσης, ενώ οι εναλλακτικές τους σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, οι πρώτες ενσωματώνονται στο DNA με τρόπο εξαρτώμενο από την αντιγραφή, ενώ οι δεύτερες όχι⁽¹³⁾. Οι διαφορές στη δομή τους και στα σύμπλοκα που σχηματίζουν μεταβάλλουν την προσβασιμότητα των νουκλεοσωμάτων από τους μεταγραφικούς παράγοντες, τους μηχανισμούς αντιγραφής-επιδιόρθωσης του DNA, καθώς και το βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης⁽¹⁴⁾.



Εικόνα 4. Απεικόνιση των κανονικών ιστονών και των εναλλακτικών ισομορφών τους. Παρουσιάζεται το συντηρημένο histone fold domain (HFD) και θέσεις μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων⁽¹⁸⁾.

Η ιστόνη H2A έχει τέσσερις κανονικές ισομορφές (H2A.x, H2A.z, macroH2A και H2ABbD) και την ειδική για τον όρχι ισομορφή tH2A. Η H2Ax εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA (DDR, DNA damage response) και στη συμπύκνωση των φυλετικών X και Y χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Η H2A.z συνδέεται με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς που συμπεριλαμβάνουν την ενεργοποίηση-απενεργοποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού, την επιμήκυνση του mRNA από την RNA πολυμεράση II,

τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κ.α. Η macroH2A συμμετέχει στην απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος των θηλυκών γαμετών και στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης μέσω αμφίσημων τροποποιήσεων. Η ισομορφή tH2A εμπλέκεται στη μειωτική διαίρεση και στην αντικατάσταση των μεταβατικών πρωτεϊνών από τις πρωταμίνες⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Η ιστόνη H2B έχει μια γνωστή ισομορφή, την tH2B, η οποία συνδέεται με τη σπερματογένεση. Έχει βρεθεί σε μειωτικές και μετά-μειωτικές σπερματίδες, ενώ μαζί με την tH2A εμπλέκονται στη συμπύκνωση της χρωματίνης και στη μορφολογία της κεφαλής του σπέρματος^(19, 20).

Η ιστόνη H3 έχει πέντε ισομορφές: την H3.1, την H3.2, την H3.3, την H3t και την CENPA. Οι H3.1 και H3.2 είναι οι κανονικές ισομορφές και διαφέρουν μεταξύ τους μόλις κατά ένα αμινοξύ. Η H3.3 κωδικοποιείται από δυο παράλογα γονίδια (H3f3a και H3f3b) στο γονιδίωμα των θηλαστικών και διαφέρει από την H3.1 κατά 5 αμινοξέα⁽¹⁷⁾. Ανάλυση Chip (Chromatin immunoprecipitation) έδειξε ότι η H3.3 συνδέεται με μεταγραφικά ενεργές περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία της H3K4me₃, ενώ η H3.1 σχετίζεται με μεταγραφικά ανενεργές περιοχές χρωματίνης^(21, 22). Μετάγραφα του γονιδίου H3f3a ανιχνεύονται σε όλα τα σπερματοκύτταρα του όρχεως, ενώ του H3f3b σε σπερματοκύτταρα κατά την πρόφαση της μείωσης. Η διαγραφή του H3f3b σε ποντίκια προκαλεί στειρότητα, ως αποτέλεσμα μειωμένης ενσωμάτωσης της H3.3 σε μειωτικά σπερματοκύτταρα και απλοειδείς σπερματίδες. Επιπλέον, επιφέρει ατροφία του όρχεως, μειωμένη παραγωγή σπέρματος και μη ενσωμάτωση των πρωταμινών⁽²³⁻²⁵⁾. Η ισομορφή H3t (H3.4) διαφέρει κατά 5 αμινοξέα από την H3.1, βρίσκεται στους όρχεις και συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στα μειωτικά σπερματοκύτταρα και τις απλοειδείς στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες^(26,27).

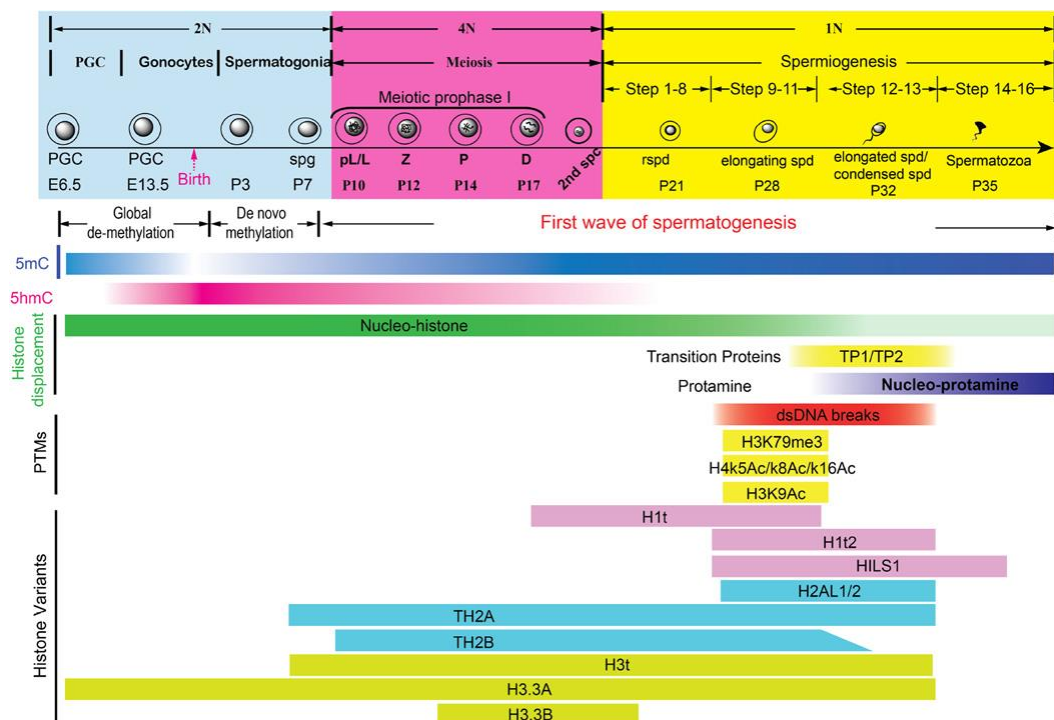
Τα κεντρομερίδια είναι εξειδικευμένες χρωματινικές ακολουθίες, στις οποίες εντοπίζεται το σύμπλεγμα του κινητοχώρου, με σκοπό να δημιουργήσει μια πλατφόρμα πρόσδεσης των χρωμοσωμάτων με την μιτωτική άτρακτο, κατά την κυτταρική διαίρεση⁽²⁸⁾. Η ειδική ισομορφή της ιστόνης H3 που συναντάται στα κεντρομερίδια ονομάζεται CENP-A (centromere protein A). Η ανθρώπινη CENP-A έχει ομολογία μόνο 50% με την κανονική ισομορφή H3.1⁽²⁹⁾.

Στον άνθρωπο η συνδετική ιστόνη H1 έχει 11 ισομορφές με εξαιρετικά αποκλίνουσες ακολουθίες. Από αυτές οι H1.0-H1.5 και η H1x εκφράζονται στα σωματικά κύτταρα, ενώ οι H1t, H1T2, H1LS1 και H1so εκφράζονται στον όρχι⁽³⁰⁾. Η H1t, στα σπερματοκύτταρα του αρουραίου, σχετίζεται με την αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη που είναι απαραίτητη για το μειωτικό ανασυνδυασμό και την αντικατάσταση των κανονικών ιστονών από τις πρωταμίνες^(31, 32). Η H1T2 εκφράζεται σε απλοειδείς σπερματίδες βήματος 2-12 και η διαγραφή της από τον ποντικό επιφέρει μορφολογικές ανωμαλίες στην κεφαλή του σπέρματος, οι οποίες οδηγούν σε υπογονιμότητα^(33, 34). Η H1LS1 (spermatid-specific linker

histone H1-like protein) εκφράζεται σε στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες βήματος 9-15 και κωδικοποιείται από το συνεχόμενο (χωρίς ιντρόνια) γονίδιο Hils1. Είναι η λιγότερο συντηρημένη ισομορφή της H1 και το γονίδιό της βρίσκεται εντός του ιντρονίου 8 της α - sarcoglycan⁽³⁵⁻³⁷⁾.

1.5 Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ο ρόλος τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Οι ιστόνες υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην αμινο-τελική ουρά τους, οι οποίες μεταβιβάζονται στους απογόνους και επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης⁽³⁸⁾. Οι συνδυασμοί των τροποποιήσεων αυτών σχηματίζουν τον κώδικα των ιστονών (histone code) και μπορούν να δρουν είτε ενεργοποιητικά, είτε κατασταλτικά προς τη γονιδιακή έκφραση, μέσω διαφορετικών μορίων-τελεστών (effector proteins, readers)⁽³⁹⁾. Στη διαδικασία της σπερμιογένεσης συμβάλλουν στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης, τον ομόλογο ανασυνδυασμό και τη μετάβαση από τις βασικές ισομορφές στις ενδιάμεσες πρωτεΐνες (transition proteins) και τελικά στις πρωταμίνες (εικ. 5).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της χρονικής διαδοχής επιγενετικών τροποποιήσεων κατά τη σπερματογένεση στα ποντίκια. Τα κύτταρα της γαμετικής σειράς μεταβαίνουν από ένα διπλοειδές στάδιο (πρόδρομα γαμετικά κύτταρα και σπερματογόνια), σε ένα τετραπλοειδές (σπερματοκύτταρα) και τελικά στο απλοειδές (σπερματίδες). Σημειώνονται οι αλλαγές στα επίπεδα μεθυλίωσης του γενετικού υλικού (global de-methylation, de novo methylation, 5mC, 5hmC), οι ειδικές για τον όρχι ισομορφές των ιστονών και οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που συμμετέχουν στην αντικατάστασή τους από τις πρωταμίνες⁽¹⁷⁾.

Η ακετυλίωση εξουδετερώνει το θετικό φορτίο σε κατάλοιπα λυσίνης, στην άμινοτελική ουρά των ιστονών. Σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργές περιοχές, καθώς διευκολύνει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA⁽³⁸⁾. Στα σπερματοκύτταρα η υπερ-ακετυλίωση της ιστόνης H4 ενισχύει την αποσυμπύκνωση του DNA και διευκολύνει τη μετάβαση στις πρωταμίνες (histone-to-protamine transition)⁽⁴⁰⁾.

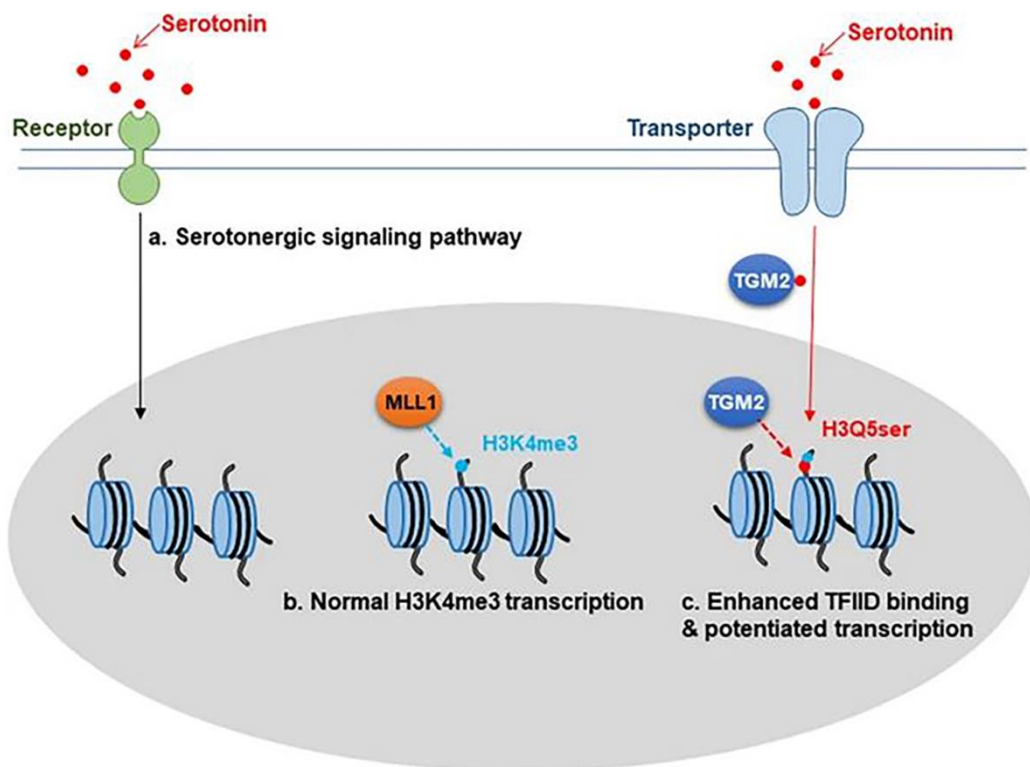
Η μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης, αργινίνης και ιστιδίνης των ιστονών H3 και H4 σχετίζεται τόσο με την ενεργοποίηση, όσο και με την απενεργοποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού. Οι λυσίνες μπορούν να μονο-, δι- και τρι-μεθυλιωθούν. Οι αργινίνες μονο- και δι-μεθυλιώνονται, συμμετρικά ή ασύμμετρα και οι ιστιδίνες μονο-μεθυλιώνονται. Από τις περισσότερο μελετημένες τροποποιήσεις είναι η H3K4me_{1/2/3}, η οποία σχετίζεται με μεταγραφικά ενεργούς υποκινητές. Αντίθετα, οι H3K9me₃ και H3K27me₃ συναντώνται σε ετεροχρωματικές περιοχές και ανενεργούς υποκινητές, αντίστοιχα⁽⁴¹⁾. Κατά τη σπερματογένεση, η H3K9me₃ χαρακτηρίζει επίσης την ετεροχρωματίνη και η H3K27me₃ βρίσκεται σε υποκινητές γονιδίων που ενεργοποιούνται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη⁽⁴²⁾.

Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται σε όλες τις ιστόνες και διαμεσολαβεί πολλές διαφορετικές διαδικασίες. Η φωσφορυλίωση στη θρεονίνη 3, στη σερίνη 10 και στη σερίνη 28 της ιστόνης H3 σχετίζεται με τη συμπύκνωση της χρωματίνης, όπως και η H2AT120ph. Ακόμη, η φωσφορυλίωση της σερίνης 139, στην ιστόνη H2A.x συνδέεται με την επιδιόρθωση του DNA. Σε ότι αφορά τον έλεγχο της μεταγραφής μπορεί να λειτουργεί είτε ενεργοποιητικά (π.χ. H3S10ph-H3K14ac-Gcn5-regulated gene transcription), είτε κατασταλτικά (π.χ. H4S1ph)⁽⁴³⁾.

Ο λειτουργικός ρόλος της ουβικιτινίωσης αφορά την επιδιόρθωση του DNA και τη ρύθμιση (έναρξη ή αποσιώπηση) της μεταγραφής. Η πιο γνωστή τροποποίηση αυτής της μορφής είναι η H2Aub που συναντάται σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA (satellite repeats) και η H2Bub, η οποία συνδέεται με μεταγραφικά ενεργά γονίδια^(44, 45). Στη σπερματογένεση, οι δυο αυτές τροποποιήσεις συναντώνται στο σωματίο XY (sex body) των παχυταινικών σπερματοκυττάρων, σε θέσεις επιδιόρθωσης του DNA από την πρωτεΐνη RNF8 ή μπορούν να σημάνουν γονίδια προς ενεργοποίηση⁽⁴⁶⁾.

Άλλες γνωστές τροποποιήσεις είναι η σουμοϋλίωση που προσομοιάζει την ουβικιτινίωση και η ADP-ριβοσυλίωση. Η σουμοϋλίωση καταλοίπων λυσίνης καταστέλλει τη μεταγραφή διαμέσου μεθυλίωσης των υποκινητών, απενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων και προσέλκυσης κατασταλτικών συμπλόκων. Ταυτόχρονα, είναι δυνατόν να διευκολύνει την πρόσδεση της RNA polymerase II σε ήδη ενεργά γονίδια, αλλά και την από-μεθυλίωση γονιδίων προς ενεργοποίηση, μέσω της RNF4^(47, 48). Η ADP-ριβοσυλίωση προσθέτει αρνητικό φορτίο και απωθεί το DNA από τα νουκλεοσώματα, μέσω

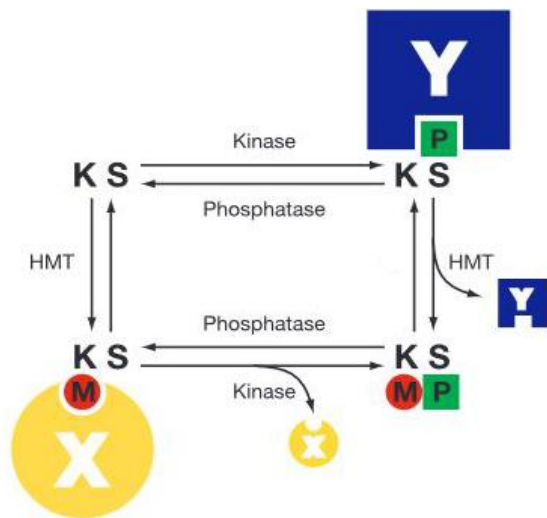
ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σχετίζεται με την αποσυμπύκνωση του DNA για την αντιγραφή και την επιδιόρθωσή του, ενώ κατά την μεταγραφή επηρεάζει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων⁽⁴⁹⁾. Τέλος, πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν πως στη γλουταμίνη 5 της ιστόνης H3 είναι δυνατόν να προστεθεί ένα μόριο σεροτονίνης, από την Transglutaminase 2 (TGM2), σχηματίζοντας έτσι ιστονική 5-ύδροξυ-τροπταμίνη (H3Q5ser). Η τροποποίηση αυτή, σε συνδυασμό με τη γειτονική H3K4me₃, στρατολογούν τον παράγοντα TFIIID και προωθούν την έναρξη της μεταγραφής (εικ. 6)^(50, 51).



Εικόνα 6. Μοντέλο ρύθμισης της σεροτονίνης. **a.** Η σηματοδοτική οδός **b.** Η μεθυλίωση της H3K4 από τις SET1 και MLL1 ρυθμίζει την μεταγραφή. **c.** Το συνδυαστικό μοτίβο τροποποιήσεων H3K4me₃Q5ser ενισχύει την αλληλεπίδραση με μόρια-τελεστές, όπως ο TFIIID⁽⁵¹⁾.

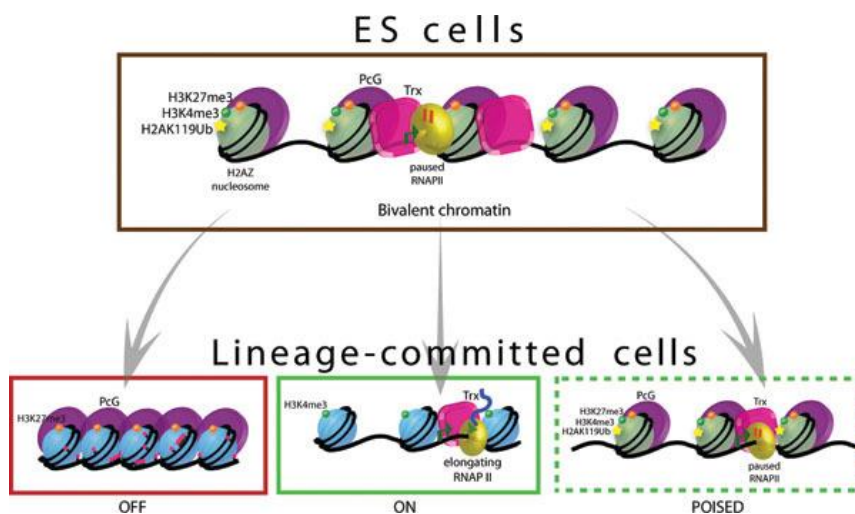
Η ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας των κυττάρων προϋποθέτει, εκτός από την αλλαγή του βαθμού συμπύκνωσης του DNA και την πρόσδεση μορίων τελεστών που αναγνωρίζουν τις παραπάνω τροποποιήσεις (PTM's, post translational modifications). Η μεταβολή των μετα-μεταφραστικών αυτών τροποποιήσεων (π.χ. απο-μεθυλίωση λυσίνης) διαμορφώνει επίσης την ικανότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Ωστόσο, η απο-μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης (κατασταλατικό σήμα) δεν προτιμάται συχνά στη φύση. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης ή θρεονίνης που γεινιάζουν με

μεθυλιωμένες λυσίνες παρέχει ένα μέσο απώθησης των μεταγραφικών παραγόντων, χωρίς τη διαγραφή της επιγενετικής πληροφορίας^(52, 53). Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται «διακοπτής φωσφορυλίωσης/μεθυλίωσης» και παρουσιάζεται στην εικόνα 7. Παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού αποτελεί ο H3K9me₃/H3S10ph. Η HP1 αναγνωρίζει και προσδένεται στην H3K9me₃ στη μεσόφαση, διαμεσολαβώντας τη δημιουργία ετεροχρωματίνης και την αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης. Η φωσφορυλίωση της H3S10 από την Aurora B, στην αρχή της μίτωσης, προκαλεί την αποσύνδεση της HP1.



Εικόνα 7. Τρόπος λειτουργίας των «διακοπών φωσφορυλίωσης/μεθυλίωσης». PTM's όπως η μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης (K) και/ή φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης (S) στις κανονικές ισομορφές ιστονών, τροποποιούν την ικανότητα πρόσδεσης μορίων-τελεστών. HMT: histone methyltransferase. Εικόνα τροποποιημένη από Fischle et al., 2003⁽⁵²⁾

Ένας επιπλέον τρόπος διατήρησης της επιγενετικής μνήμης, με την ταυτόχρονη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας, είναι η παρουσία αμφίσημων τροποποιήσεων στην ίδια χρωματική περιοχή (bivalent chromatin domains). Τα μοτίβα αυτά συνδυάζουν την παρουσία ενεργοποιητικών και κατασταλτικών τροποποιήσεων (εικ. 8).



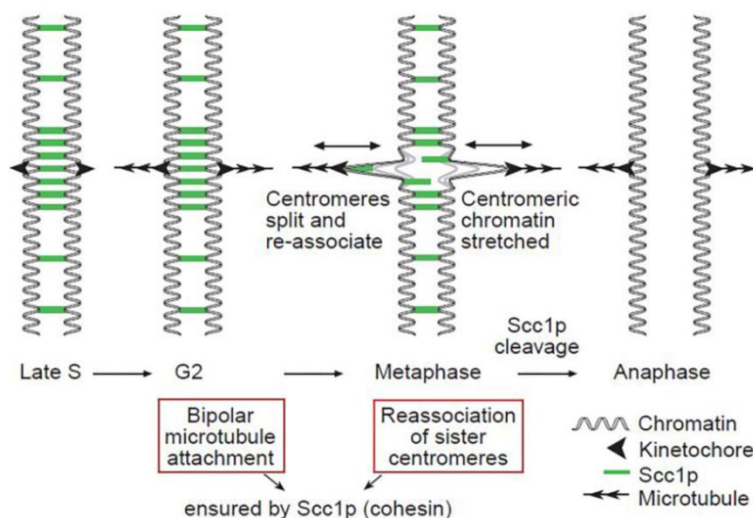
Εικόνα 8. Η γονιδιακή ρύθμιση βάσει των αμφίσημων τροποποιήσεων⁽⁵⁵⁾.

Παράδειγμα αποτελεί η ύπαρξη της H3K27me₃ σε υποκινητές γονιδίων που σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη, στα βλαστικά κύτταρα (εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, σπερματογόνια κτλ). Η ταυτόχρονη παρουσία της H3K4me₃ μαρκάρει τα γονίδια αυτά, ώστε να εκφραστούν μετά τη γονιμοποίηση⁽⁵⁴⁾.

1.6 Η προστασία της συνοχής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων

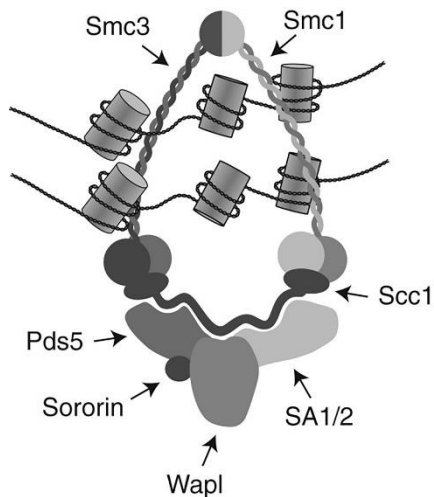
Η δημιουργία φυσικών συνδέσεων μεταξύ των αδελφών χρωματίδων αποκαλείται συνοχή (sister chromatid cohesion). Αυτή αντιτίθεται στις ελκτικές δυνάμεις που δημιουργούν οι μικροσωληνίσκοι, συμβάλλοντας έτσι στον ορθό προσανατολισμό των χρωμοσωμάτων και στο συμμετρικό διαχωρισμό τους (εικ. 9)⁽⁵⁶⁾. Ο ρόλος της συνοχής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων είναι διπλός. Αφενός προστατεύει από τη δημιουργία ανευπλοειδών/πολυπλοειδών θυγατρικών κυττάρων και αφετέρου διευκολύνει την επιδιόρθωση των διπλών σχάσεων του DNA (double strand DNA breaks), με τη χρήση του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η προστασία της συνοχής και ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι εξίσου σημαντικά και κατά τις μειωτικές διαιρέσεις. Λάθη κατά τη γαμετογένεση στον άνθρωπο οδηγούν είτε σε αυτόματες αποβολές, είτε σε τρισωμίες με κυμαινόμενο βαθμό βαρύτητας (π.χ. σύνδρομο Down, σύνδρομο Edwards, σύνδρομο Patau).

Η προστασία της συνοχής διαμεσολαβείται από ένα πολυπαραγοντικό σύμπλοκο που ονομάζεται cohesin. Το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με το DNA κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου, με τη βοήθεια της adherin. Στη συνέχεια, η αλληλεπίδραση αυτή σταθεροποιείται μετά από ακετυλίωση μιας υπομονάδας του. Σε αυτό συμμετέχει και η sororin, η οποία προσδένεται και αναστέλλει τον παράγοντα Wapl.



Εικόνα 9. Απεικόνιση της κατανομής της cohesin (Sccp1) κατά μήκος των χρωμοσωμάτων, της σύνδεσης των κινητοχώρων με τους μικροσωληνίσκους, της μετακίνησης των κεντρομεριδίων και της έναρξης της ανάφασης. Εικόνα από Tanaka T. et al., 2000⁽⁵⁶⁾.

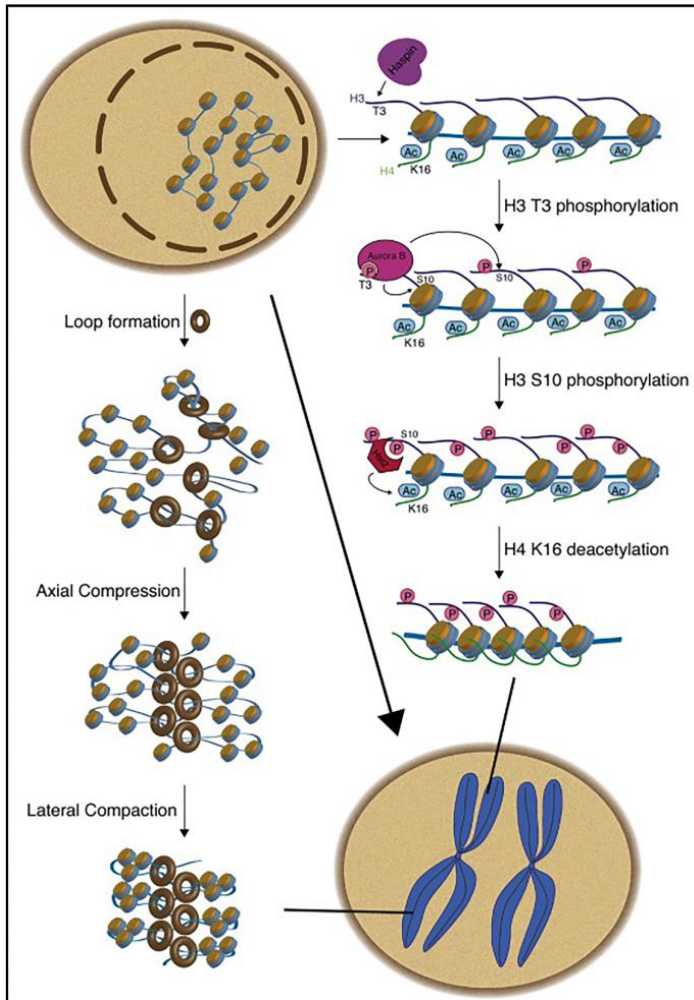
Το σύμπλοκο της cohesin αλληλεπιδρά με το DNA υπό την μορφή «δαχτυλιδιού» (ring). Οι δύο βασικές υπομονάδες Smc1 και Smc3 (structural maintenance of chromosomes 1 and 3) δημιουργούν μια δομή «μεντεσέ» (“hinge”) όταν συνδέονται μεταξύ τους, περικλείοντας το DNA ενδιάμεσα, μέσω ενός δομικού μοτίβου «hinge». Στο αντίθετο άκρο σχηματίζουν μια υποπεριοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD: nucleotide binding domain) η καθεμιά. Αυτές ενώνονται μέσω μιας τρίτης υπομονάδας, της Scc1 (kleisin subunit). Μια τέταρτη υπομονάδα, η Scc3 στις ζύμες (STAG στον άνθρωπο, SA ½ στον ποντικό) προσδένεται στην Scc1 και διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση με ρυθμιστικούς παράγοντες, όπως ο Wapl, ο Pds5 και η sororin. Η αλληλεπίδραση αυτή καθορίζει τη σταθερότητα της πρόσδεσης του συμπλόκου της cohesin στο DNA (εικ. 10)⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾.



Εικόνα 10. Η δομή του συμπλόκου της cohesin στα σπονδυλωτά ζώα. Αναπαριστάται ο τρόπος που περικλείουν τις δυο αδελφές χρωματίδες⁽⁵⁷⁾.

Κατά την πρόφαση της μιτωτικής διαίρεσης, η χρωματίνη δημιουργεί δομές που μοιάζουν με θηλιές για να διευκολύνει τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Η διαδικασία αυτή διαμεσολαβείται από τα σύμπλοκα της condensin (condensin I and II complexes). Τα σύμπλοκα αυτά συμπεριλαμβάνουν δύο πρωτεΐνες της οικογένειας SMC (structural maintenance of chromosomes), τρεις υπομονάδες που δεν ανήκουν στην παραπάνω οικογένεια (non-smc subunits), μια kleisin και δυο πρωτεΐνες που διαθέτουν HEAT επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (HEAT repeat containing proteins). Η δημιουργία βρόχων μήκους 80-120kb από τα σύμπλοκα της condensin λαμβάνει χώρα σε ειδικές θέσεις, ενώ υποβοηθείται τοπικά και από την πλευρική συμπύκνωση μέσω ιστονικών τροποποιήσεων. Κατά την πρόοδο της μίτωσης, η cohesin απελευθερώνεται από τους χρωμοσωμικούς βραχίονες μέσω της topoisomerase IIa και η συμπύκνωση προχωρά σε αξονικό επίπεδο (εικ. 11).

Στην ανάφαση, δύο σύμπλοκα φωσφατασών, τα PP1γ-RpoMan και PP1γ-Ki67, αποφωσφορυλιώνουν τις μιτωτικές κινάσες Haspin και Aurora B, διευκολύνουν την ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου και υποκινούν την απο-συμπύκνωση της χρωματίνης⁽⁶⁰⁻⁶²⁾.

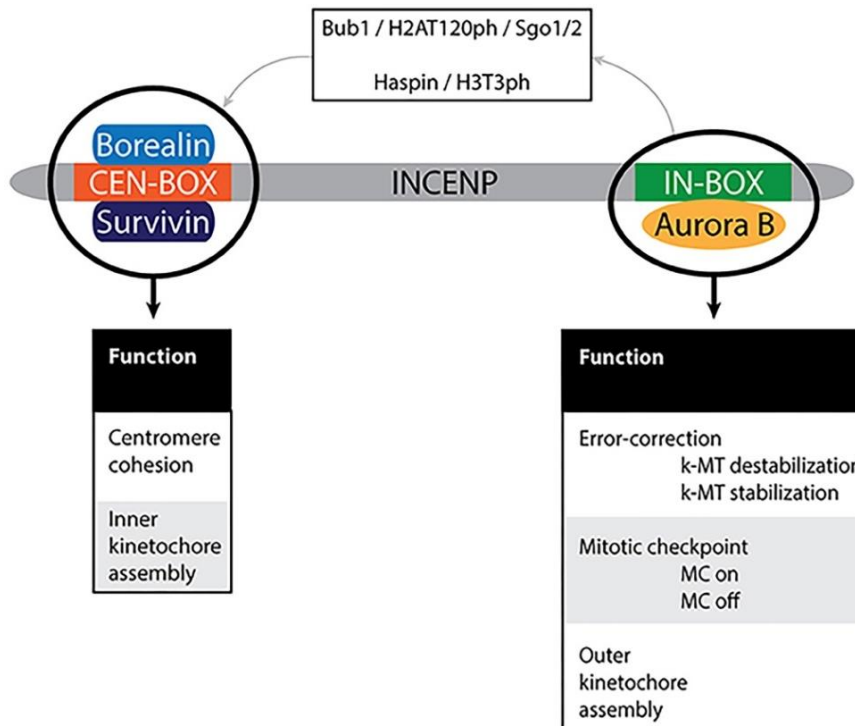


Εικόνα 11. Η συγκρότηση των μιτωτικών χρωμοσωμάτων είναι μια πολυεπίπεδη διαδικασία. Η συμπύκνωση μέσω της condensin στην πρόφαση οδηγεί στη δημιουργία βρόχων. Αυτοί συμπιέζονται ακόμα περισσότερο κατά μήκος (axial compression) και πλευρικά (lateral compaction). Την ίδια στιγμή, ορισμένες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, π.χ. H3T3ph, H3S10ph, H4K16deac, ενισχύουν την κατά τόπους συμπύκνωση της χρωματίνης (histone-driven compaction)⁽⁶⁰⁾.

1.7 Το chromosomal passenger complex (CPC) κατευθύνει την πορεία των μιτωτικών διαιρέσεων

Το chromosomal passenger complex ρυθμίζει την πρόσδεση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου με τους κινητοχώρους, την ενεργοποίηση του SAC (spindle assembly checkpoint) και την κυττοκίνηση (Carmena et al., 2012⁶³). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από δυο υποομάδες: την ενζυμική (Aurora B kinase) και την υπομονάδα στόχευσης (INCENP, Borealin, Survivin). Η ολοκλήρωση του CPC και η πλήρης στόχευσή του στα

κεντρομερίδια απαιτεί τη δημιουργία ενός τετραμερούς συμπλόκου. Η Borealin και η Survivin προσδένονται στο άμινο-τελικό άκρο της INCENP (CEN-BOX) και η Aurora B στο IN-BOX του καρβόξυ-τελικού της άκρου (εικ. 12)⁽⁶⁴⁾.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση του CPC στα σπονδυλωτά. Οι δυο υπομονάδες εκτελούν διαφορετικές λειτουργίες μεταξύ τους⁽¹²¹⁾.

Στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα η Aurora B φωσφορυλιώνει την H3S10 στους p βραχίονες των χρωμοσωμάτων κατά την φάση S, με σκοπό τη μεταγραφή των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (centromere repeats) των κεντρομεριδίων. Η κινάση αυτή ενεργοποιεί την τελομεράση, η οποία εξασφαλίζει τη διατήρηση των άκρων των χρωμοσωμάτων⁽⁶⁵⁾. Κατά την έναρξη της μιτωτικής διαίρεσης, η ενεργοποίηση, μέσω φωσφορυλίωσης, της ίδιας κινάσης οδηγεί σε απενεργοποίηση πρωτεϊνών αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων, όπως η MCAK και η Op18. Το γεγονός αυτό συνδυάζεται με τη δημιουργία βαθμίδωσης συγκέντρωσης του Ran-GTP και έχει διπλή λειτουργία: τη σηματοδότηση της συναρμολόγησης της μιτωτικής ατράκτου και τη χωροθέτηση της⁽⁶⁶⁾. Παράλληλα η H3S10ph σηματοδοτεί την έναρξη της συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων.

Οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος CPC εντοπίζονται στα σκέλη των χρωμοσωμάτων κατά την πρόφαση, όπου ρυθμίζουν τη συμπύκνωσή τους, στο εσωτερικό των κεντρομεριδίων και τους κινητοχώρους κατά την προμετάφαση/μετάφαση, όπου ορίζουν

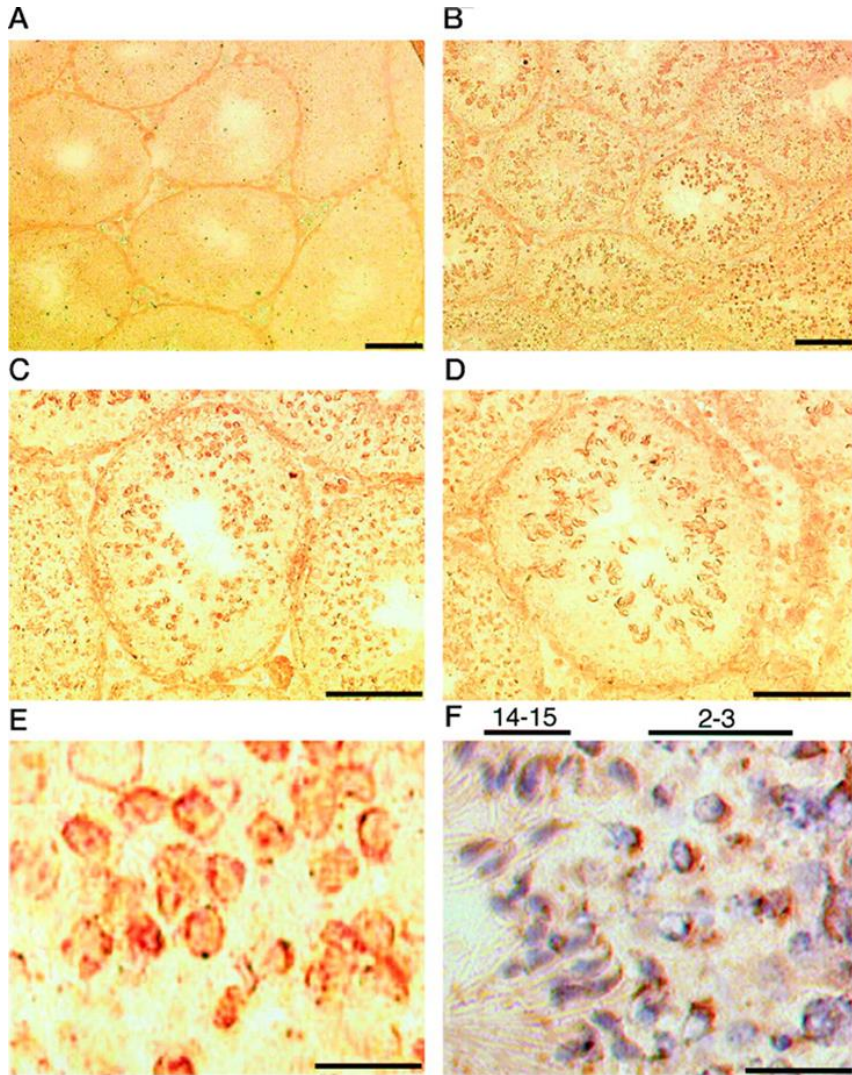
τον προσανατολισμό των χρωμοσωμάτων και στη ζώνη αποκοπής (cleavage furrow) κατά την ανάφαση. Στην τελόφαση, εντοπίζονται στο μεσόσωμα (midbody), όπου συμμετέχουν στη σωστή αποκοπή του⁽⁶⁷⁾.

Η παρουσία δυο ξεχωριστών βαθμίδων του CPC, μία προσανατολισμένη στους κινητοχώρους και μία στο εσωτερικό των κεντρομεριδίων (inner centromere), διασφαλίζει την ανίχνευση της τάσης που θα οδηγήσει στον ορθό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και την ενεργοποίηση του μηχανισμού διόρθωσης σφαλμάτων⁽⁶⁸⁾. Ο μηχανισμός αυτός εξαρτάται από την ενεργοποίηση της Aurora B και στις δυο θέσεις (κινητοχώροι και εσωτερικό των κεντρομεριδίων) και είναι συντηρημένος στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς⁽⁶⁹⁾. Ταυτόχρονα, η απομάκρυνση του CPC από τα διαχωριζόμενα αναφασικά χρωμοσώματα είναι απαραίτητη για τον εκ νέου σχηματισμό ενός λειτουργικού πυρηνικού φακέλου και την αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων^(66,70).

1.8 Η μιτωτική κινάση Haspin κωδικοποιείται από το γονίδιο GSG2

Στα πλαίσια της έρευνας για την πορεία της διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων, το 1994 απομονώθηκαν 3 ειδικά για τη σπερματογένεση γονίδια (**germline specific genes**, gsg1-3)⁽⁷¹⁾. Το δεύτερο από αυτά (GSG2) αναγνωρίστηκε στη συνέχεια ως αυτό που κωδικοποιεί τη Haspin. Τρία χρόνια αργότερα, το 1997, χαρτογραφήθηκε η θέση του γονιδίου στο χρωμόσωμα 11 του ποντικού⁽⁷²⁾ και λίγο αργότερα το ομόλογο στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 17 (17p13). Η γεινίαση με το γενετικό τόπο om (onum mutant, s στα σπερματοζώα), ο οποίος έχει χαρακτηριστικό φαινότυπο και καταλήγει σε εμβρυικό θάνατο, οδήγησε στην αρχική υπόθεση ότι το προϊόν του γονιδίου ίσως να σχετίζεται είτε με τον om, είτε με τον s. Μετά από πειράματα ανάλυσης κατά Northern, το mRNA του γονιδίου ανιχνεύθηκε σε όρχεις ενήλικου ποντικού και ποντικού 24 ημερών, αλλά όχι σε ποντικούς 4, 10 ή 16 ημερών, γεγονός που υπέδειξε ότι εκφράζεται σε μετά-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες^(73, 74).

Η παραγόμενη πρωτεΐνη βρέθηκε να έχει δραστηριότητα κινάσης Ser/Thr. Μετά από έκτοπη έκφραση (transient transfection) ανιχνεύτηκε στον πυρήνα σωματικών κυττάρων, όπου προκάλεσε συσσώρευση τους στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου (G₁ arrest). Ως εκ τούτου, η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε Haspin (**H**aploid **g**erm cell-**s**pecific **n**uclear **p**rotein **k**inase). Στην ίδια μελέτη, ανοσοϊστοχημική εξέταση τομών κρουστάτη από ενήλικο ποντικό, με ορό αντισωμάτων έναντι της Haspin (εικ.13), έδειξε ότι είναι παρούσα σε πρώιμες στρογγυλές (βήματα 2-3) και όψιμες επιμηκυνόμενες (βήματα 14-15) σπερματίδες, όχι όμως σε προ-μειωτικά, μειωτικά ή σωματικά κύτταρα του όρχεως⁽⁷⁵⁾.

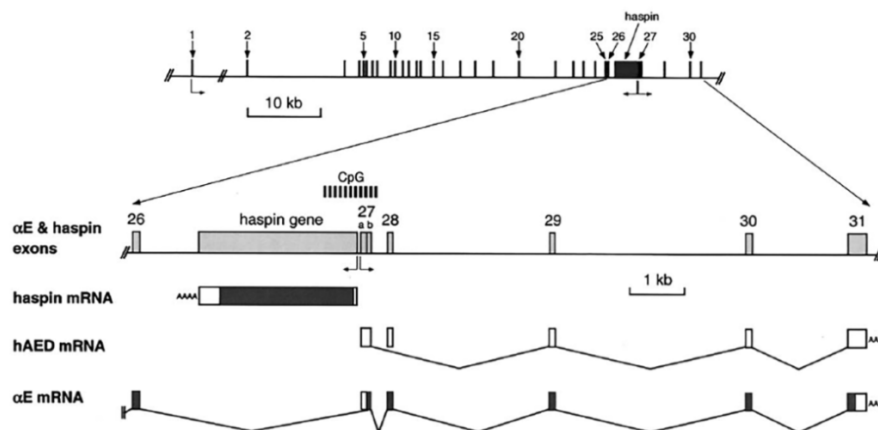


Εικόνα 13. Ανοσοϊστοχημική χρώση τομών κρουσάτη από όρχεις ενήλικου ποντικού, με αντίσωμα έναντι της Haspin. **A.** Αρνητικός μάρτυρας (preimmune rabbit serum). **B-F.** Ο εντοπισμός της Haspin. Τα **C** και **D** απεικονίζουν στρογγυλλές και επιμήκεις σπερματίδες, ενώ το **E** αποτελεί μεγέθυνση. Στο **F** έχει γίνει και χρώση με αιματοξυλίνη. Οι αριθμοί αναφέρονται στα βήματα της σπερμιογένεσης (περισσότερες πληροφορίες αναφέρονται στην παράγραφο 1.9.1). Scale bars 100 μm (A–D) and 20 μm (E and F)⁽⁷⁵⁾.

Αποτελέσματα από την ομάδα που ανακάλυψε το γονίδιο αναφέρουν πως το mRNA της Haspin ανιχνεύεται ειδικά στους όρχεις, όχι όμως σε σωματικούς ιστούς⁽⁷⁵⁾. Λίγο αργότερα, άλλες ερευνητικές ομάδες την εντόπισαν και σε άλλους ιστούς, όπως στο θύμο αδένα, τον μυελό των οστών, το έντερο, το σπλήνα και σε ορισμένους εμβρυικούς ιστούς⁽⁷⁶⁾. Ωστόσο, η χρήση τεχνικών αυξημένης ευαισθησίας, όπως η qPCR, έδειξε πως τα επίπεδα αυτά είναι στα όρια της ανίχνευσης⁽⁷⁷⁾. Μετά από έλεγχο ωοκυττάρων και εμβρύων ποντικού σε προ-εμφυτευτικό στάδιο βρέθηκε ότι το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο της Haspin εκφράζεται από τη μείωση έως το ζυγωτό (one-cell embryo) και πως τα επίπεδα έκφρασής του πέφτουν κάτω από το 30% στα επόμενα στάδια⁽⁷⁸⁾.

1.8.1. Η Haspin στον άνθρωπο και το ποντίκι

Η θέση του γονιδίου της Haspin τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο ποντίκι βρίσκεται εντός ενός ιντρονίου της integrin αE, ενώ το ίδιο το γονίδιο είναι και στις δύο περιπτώσεις συνεχόμενο, αφού δεν διαθέτει ιντρόνια (εικ. 14). Μεταξύ τους μοιράζονται 72% νουκλεοτιδική ομολογία και 62% αμινοξική, καθώς το γονίδιο στο ποντίκι είναι κατά 44 αμινοξέα μικρότερο στο άμινο-τελικό του άκρο (754 aa έναντι 798aa). Ακόμη, η 3'-αμετάφραστη περιοχή είναι μικρότερη στον άνθρωπο (ms: 531bp, hu:364bp), διαθέτει όμως μια Alu επαναλαμβανόμενη αλληλουχία⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾.

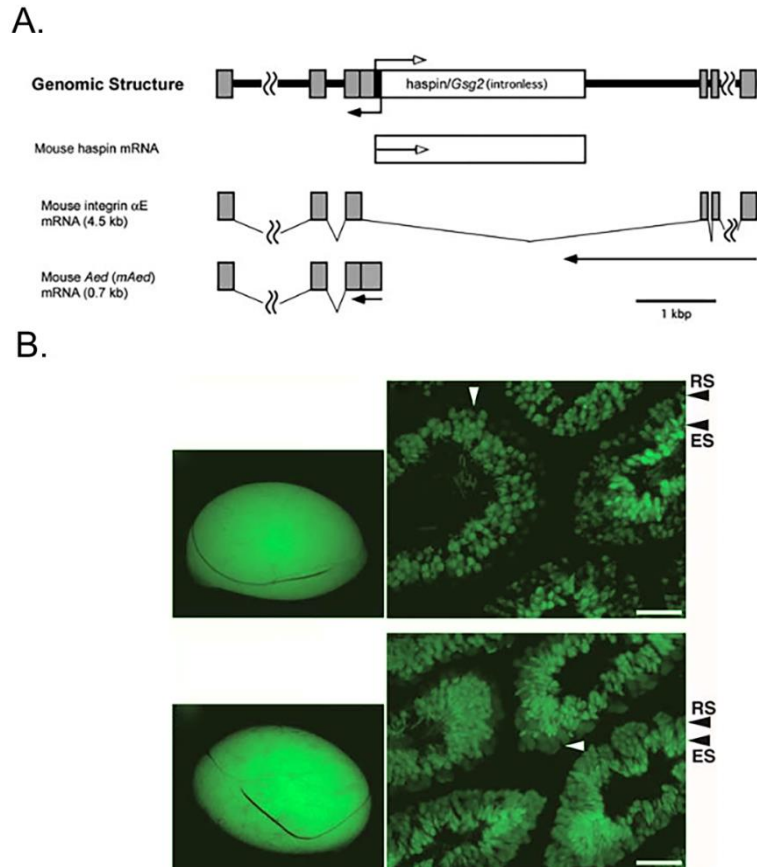


Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της θέσης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη Haspin στον άνθρωπο, εντός του ιντρονίου της integrin αE (πρώτη γραμμή). Στη δεύτερη γραμμή απεικονίζεται η 3' περιοχή του itgae. Οι επόμενες γραμμές αναπαριστούν το mRNA της Haspin, της εναλλακτικής ισομορφής Aed και της αE, αντίστοιχα. Οι αριθμοί και τα λευκά κουτιά αναφέρονται σε εξόνια. Τα σκούρα κουτιά αναφέρονται σε περιοχές που μεταφράζονται και τα κεκλιμένα βέλη σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής⁽⁷⁶⁾.

Ομόλογα της Haspin γονίδια υπάρχουν σε αρκετούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς (π.χ. ζύμες, φυτά, ψάρια, ζώα), ενώ βρίσκεται και στο νηματώδη *C. elegans*. Το καρβόξυ-τελικό της άκρο, το οποίο διαθέτει δραστικότητα κινάσης, είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ αυτών των οργανισμών (83% ταυτόσημο μεταξύ ανθρώπου και ποντικού), ενώ το άμινο-τελικό όχι (52% ταυτόσημο μεταξύ ανθρώπου και ποντικού). Η ιδιαίτερη αλληλουχία της περιοχής με τη δραστικότητα κινάσης την κατατάσσει σε μία ξεχωριστή οικογένεια άτυπων κινασών⁽⁷⁹⁾.

1.8.2. Η δομή του υποκινητή του GSG2

Δυο είναι τα βασικά σημεία ελέγχου της έκφρασης του GSG2: ο υποκινητής και η περιοχή TDMR (tissue-dependent and differentially methylated region), η οποία βρίσκεται ανοδικά από αυτόν. Ο υποκινητής στο 5' άκρο του γονιδίου έχει μήκος 193bp και είναι υπεύθυνος για την αμφίδρομη μεταγραφή της Haspin και μιας εναλλακτικής ισομορφής της ιντεγκρίνης αE, της Aed στο ποντίκι (εικ. 15^A)⁽⁸⁰⁾.



Εικόνα 15. Το προϊόν του αμφίδρομου υποκινητή του γονιδίου GSG2 στο ποντίκι εκφράζεται στους όρχεις. **A.** Σχηματική αναπαράσταση του αμφίδρομου υποκινητή του GSG2 στο ποντίκι. Στην πρώτη σειρά απεικονίζεται το mRNA της Haspin, στη δεύτερη το mRNA της integrin αE και στην τρίτη της εναλλακτικής ισομορφής Aed. **B.** Ιστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης EGFP υπό τον αμφίδρομο υποκινητή της Haspin σε διαγονιδιακά ποντίκια. Στην εικόνα φαίνονται αριστερά οι όρχεις και δεξιά τομές τους. Με άσπρα βέλη σημειώνονται παχυταινικά σπερματοκύτταρα. RS (round spermatids): στρογγυλές σπερματίδες, ES (elongating spermatids): επιμηκυνόμενες σπερματίδες. Scale bars 100μm. Τροποποιημένο από Tokuhiko et al., 2007⁽⁸⁰⁾.

Η περιοχή του υποκινητή είναι πλούσια σε GC, ενώ δεν διαθέτει θέσεις πρόσδεσης ειδικών για τη σπερματογένεση παραγόντων, όπως είναι το μοτίβο cre. Αντίθετα, περιέχει θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο E2F, ο AP2 και ο Sp1.

Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο γονιδίων που είναι απαραίτητα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και ο Sp1 προσδένεται σε υποκινητές με υψηλό περιεχόμενο GC, οι οποίοι είναι όμως αμφίδρομοι⁽⁷⁶⁾. Η οικογένεια των AP2 μεταγραφικών παραγόντων σχετίζεται με την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού ειδικών κυτταρικών τύπων και την καταστολή της τελικής διαφοροποίησης, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης⁽⁸¹⁾.

Η κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν την πρωτεΐνη EGFP υπο τον αμφίδρομο υποκινητή της Haspin (enhanced green fluorescent protein) έδειξε πως αυτός είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του γονιδίου στους όρχεις. Παράλληλα, το προϊόν του

γονιδίου εντοπίστηκε σε στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες (εικ. 15^B). Ακόμη, δοκιμές μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (gel shift assays) έδειξαν πως πρωτεϊνικά σύμπλοκα που προέρχονται από σπερματοκύτταρα μπορούν να προσδένονται σε αυτόν, χωρίς ωστόσο να ταυτοποιήσουν κάποιο από αυτά⁽⁸⁰⁾.



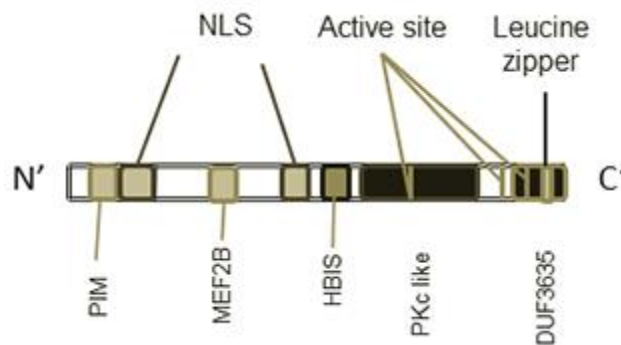
Εικόνα 16. Η θέση του TDMR ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου GSG2 στο ποντίκι ⁽⁷⁷⁾. Οι αριθμημένες κάθετες γραμμές αναπαριστούν θέσεις CpG. Σημειώνεται επίσης ο αμφίδρομος υποκινητής (promoter) που αναγνωρίστηκε από τους Tokuhiro et al., 2007⁽⁸⁰⁾.

Ανοδικά του υποκινητή της Haspin, στις θέσεις -641bp έως -517bp στο ποντίκι, βρίσκεται η περιοχή TDMR (εικ. 16). Αυτή απαρτίζεται από 5 ξεχωριστές υπο-περιοχές, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικά μεταξύ τους επίπεδα μεθυλίωσης. Οι TDMR περιοχές είναι διάσπαρτες στο γονιδίωμα του ποντικού και ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση ποικίλων κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων και των γαμετικών κυττάρων. Μια σειρά από άλλα, ειδικά για τη σπερματογένεση, γονίδια, όπως το PGK2 και το DDX4 (Mvh), διαθέτουν επίσης TDMR ανοδικά του υποκινητή τους. Στη Haspin, 3 υπό-περιοχές του TDMR βρέθηκαν υπο-μεθυλιωμένες στα γαμετικά κύτταρα του όρχεως και υπερ-μεθυλιωμένες σε κύτταρα σωματικών ιστών. Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης του TDMR της Haspin σε κύτταρα ES (embryonic stem), EG (embryonic germ) και mGS (mature germline stem) έδειξε ότι η αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης μειώνει τη λειτουργικότητα του υποκινητή κατά 60-80%, χωρίς όμως να την αναστέλλει πλήρως, στα βλαστικά κύτταρα. Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή φάνηκε να είναι απαραίτητη, αλλά όχι ικανή συνθήκη για την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της Haspin στους όρχεις⁽⁷⁷⁾.

1.8.3. Δομικά χαρακτηριστικά και συντηρημένα μοτίβα της πρωτεΐνης

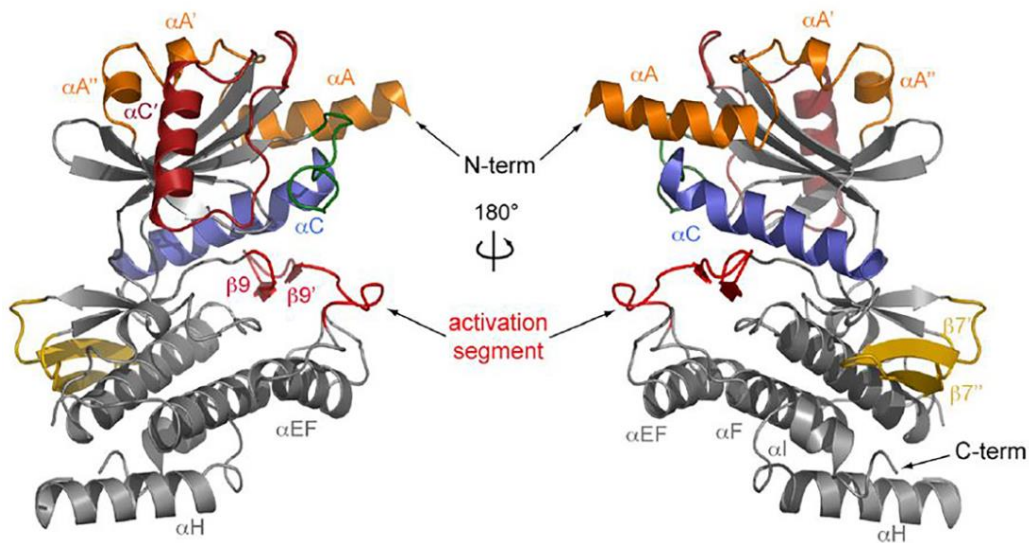
Η Haspin διαθέτει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μια βασική περιοχή στο άμινο-τελικό της άκρο, με την ίδια λειτουργία. Μεταξύ των δύο NLS (nuclear localization signal) παρεμβάλλονται μια θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης Pds5B (PIM, Pds5B interacting motif)⁽⁸²⁾ και η υποπεριοχή HBIS (Haspin Basic Inhibitory Segment)⁽⁸³⁾.

Στα χαρακτηριστικά μοτίβα που συναντώνται εντός της πρωτεΐνης συμπεριλαμβάνεται μια περιοχή ομόλογη με τον παράγοντα MEF2B (Myocyte-specific enhancement factor 2B) στο άμινο-τελικό άκρο και 3 ομόλογες των ePK's (eukaryotic protein kinases) στο καρβόξυ-τελικό. Ακόμα, υπάρχει ένα φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper), το οποίο είναι συντηρημένο μόνο μεταξύ των θηλαστικών και μια δομική περιοχή στο καρβόξυ-τελικό άκρο άγνωστης λειτουργίας (DUF 3635) (εικ. 17). Διαθέτει επίσης θέσεις φωσφωρυλίωσης από πρωτεϊνικές κινάσες, όπως είναι η protein kinase C (S/T-x-R/K), η cAMP- and cGMP- dependent protein kinase (RK-x-S/T) και η casein kinase II (S/T-x-x-D/E)⁽⁷⁴⁻⁷⁵⁾.



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση χαρακτηριστικών μοτίβων στην ακολουθία της Haspin.

Η ανάλυση της δομής της πρωτεΐνης (εικ.18) αναδεικνύει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ενεργού της κέντρου που απουσιάζουν από τις τυπικές ευκαρυωτικές κινάσες. Πρώτη σημαντική διαφορά αποτελεί το μοτίβο πρόσδεσης ATP/Mg²⁺, Asp-Phe-Gly (DFG), το οποίο έχει αντικατασταθεί από το Asp-Tyr-Thr (DYT). Επιπρόσθετα, το μοτίβο Ala-Pro-Glu (APE) έχει αντικατασταθεί από μια μεγάλη α' έλικα. Μια σειρά από δομικές ενθέσεις (α' έλικες, β' πτυχωτή επιφάνεια) και διαγραφές αυξάνουν τη σταθερότητα του ενεργού της κέντρου, προσδίδοντας έτσι στη Haspin μια διαμόρφωση άτυπης, αλλά σταθερά ενεργής κινάσης^(84- 86).

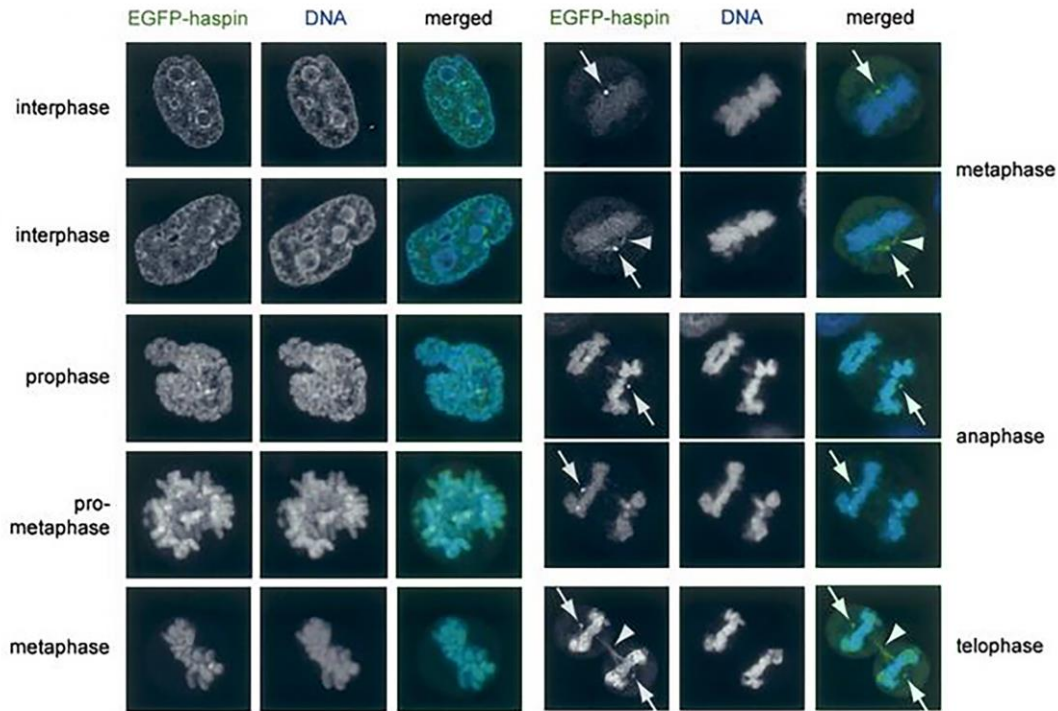


Εικόνα 18. Δομικά χαρακτηριστικά της hHaspin⁴⁵²⁻⁷⁹⁸. Με πορτοκαλί απεικονίζεται το αμινο-τελικό της άκρο και με κόκκινο το ενεργό κέντρο⁽⁸⁵⁾.

1.8.4. Η Haspin φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 3 της ιστόνης H3

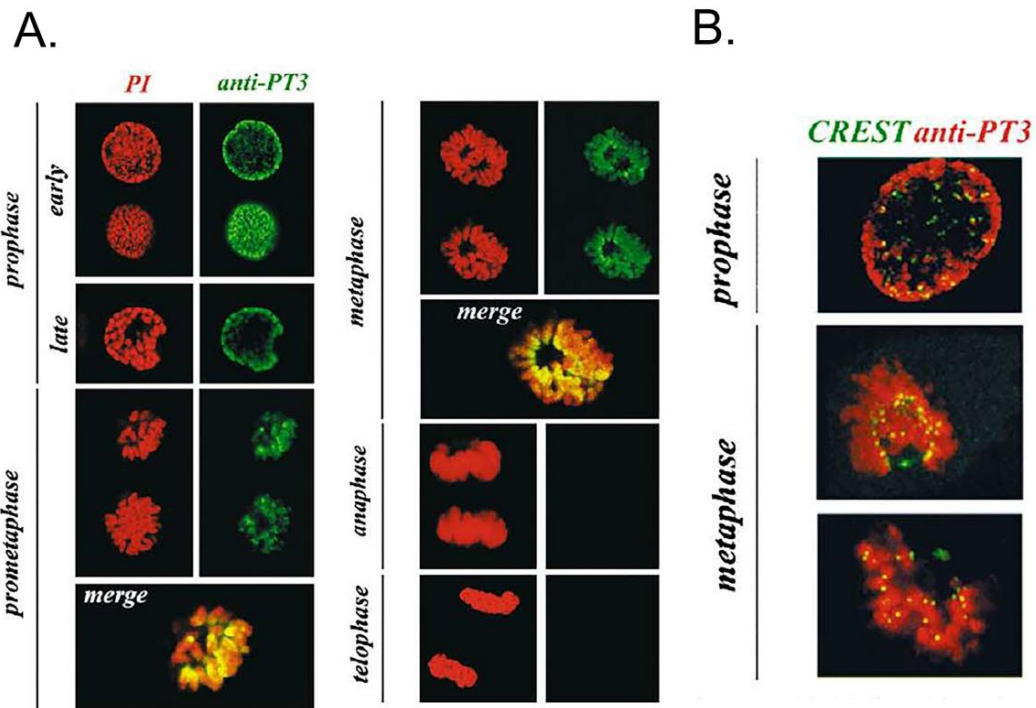
Το ενεργό κέντρο της Haspin έχει έναν ιδιαίτερα ηλεκτραρνητικό κλωβό, εξαιτίας του δεσμού υδρογόνου που δημιουργεί η Arg του μοτίβου HRD και της απουσίας της τυπικής αG' έλικας. Ο κλωβός αυτός αποτελεί σημείο πρόσδεσης για το αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3^(84, 85, 87). Η ομάδα της Dai, το 2005⁽⁸⁸⁾, έδειξε πως η Haspin μπορεί να φωσφορυλιώσει τη θρεονίνη 3, της ιστόνης H3 *in vitro* και πως η φωσφορυλίωση αυτή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της μιτωτικής διαίρεσης. Η ικανότητα της Haspin να προσδένει και να φωσφορυλιώνει το αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3 επηρεάζεται από την τρι-μεθυλίωση της διπλανής λυσίνης 4 και την μη-συμμετρική δι-μεθυλίωση της λυσίνης 2^(84, 88, 89).

Η Haspin εντοπίζεται στον πυρήνα μεσοφασικών κυττάρων και στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα, με ιδιαίτερη έμφαση στα κεντρομερίδια και τα κεντροσωμάτια, καθ' όλη τη διάρκεια της μίτωσης (εικ. 19). Η αναστολή της, μέσω τεχνικών RNAi, προκαλεί εσφαλμένη ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση, πρόωρο διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και εμφάνιση έκτοπων πόλων της μιτωτικής ατράκτου. Αντίθετα, η υπερέκφρασή της προκαλεί συσσώρευση των κυττάρων στα πρώτα στάδια της μίτωσης, καθυστερώντας την απελευθέρωση της cohesin⁽⁹⁰⁻⁹²⁾.

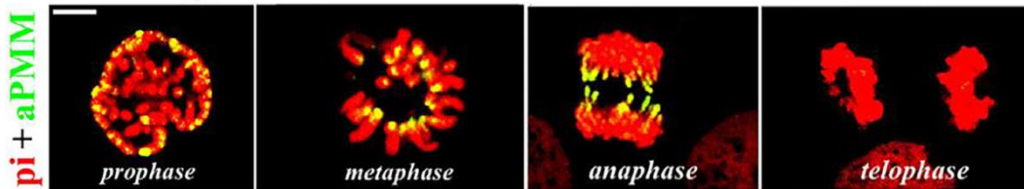


Εικόνα 19. Η κινάση Haspin βρίσκεται στον πυρήνα κατά τη μεσόφαση και εντοπίζεται στα χρωμοσώματα και σε τμήματα της μιτωτικής ατράκτου κατά τη διάρκεια της μίτωσης⁽⁸⁸⁾. Κύτταρα HeLa που υπερεκφράζουν σταθερά EGFP-Haspin.

Η H3T3rh πρωτοεμφανίζεται στην αρχή της πρόφασης της μιτωτικής διαίρεσης, κοντά στο σημείο διάσπασης του πυρηνικού φακέλου (NEBD, nuclear envelope breakdown) και στην περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη κατά την προμετάφαση. Στη μετάφαση βρίσκεται στα κεντρομερίδια, ενώ κατά την ανάφαση σταδιακά εξαφανίζεται (εικ. 20)^(88, 93). Επίσης, αποτελεί τμήμα ενός συνδυαστικού μοτίβου τροποποιήσεων (H3T3rhK4me₃R8me₂, PMM) στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3⁽⁹⁴⁾. Το μοτίβο αυτό καταλαμβάνει τις ίδιες θέσεις με την H3T3rh στη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης, αντίθετα με αυτή όμως δεν εμπλέκεται στη συμπύκνωση της χρωματίνης (εικ. 21).



Εικόνα 20. Η H3T3rh εντοπίζεται στα σκέλη των χρωμοσωμάτων⁽⁹³⁾ (A) και στις περικεντρομεριδιακές περιοχές (B) από την πρόφαση έως τη μετάφαση. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα C127 με αντίσωμα έναντι της H3T3rh (αPT3) και χρώση του DNA με propidium iodide (PI).



Εικόνα 21. Η τριπλή τροποποίηση PMM ανιχνεύεται στα σκέλη των χρωμοσωμάτων και στα κεντρομερίδια από την πρόφαση έως την ανάφαση⁽⁹⁴⁾. Έμμεσος ανοσοφθορισμός μιτωτικών κυττάρων με αντίσωμα έναντι της τροποποίησης PMM (αPMM).

1.8.5. Η Haspin απενεργοποιείται από τη φωσφατάση PP1γ και από τη ρυθμιστική υπομονάδα RepoMan

Η φωσφατάση PP1γ ανήκει στην οικογένεια PPP ευκαρυωτικών φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης και εμπλέκεται σε μια πληθώρα υπο-κυτταρικών διεργασιών. Η δραστηριότητά της μεταβάλλεται μέσω φωσφορυλίωσης και πρόσδεσης διαφορετικών ρυθμιστικών υπομονάδων. Οι τελευταίες περιέχουν συνήθως ένα RVxF μοτίβο στην αλληλουχία τους, του οποίου προηγούνται βασικά κατάλοιπα και ακολουθούν επαναλαμβανόμενα μοτίβα αγκυρίνης (ankyrin repeats)⁽⁹⁵⁾.

Η πρωτεΐνη RepoMan είναι μια από αυτές τις ρυθμιστικές υπομονάδες. Η πρόσδεσή της στην PP1γ κατά την μετάφαση οδηγεί το σύμπλοκο στην χρωματίνη, όπου παραμένει

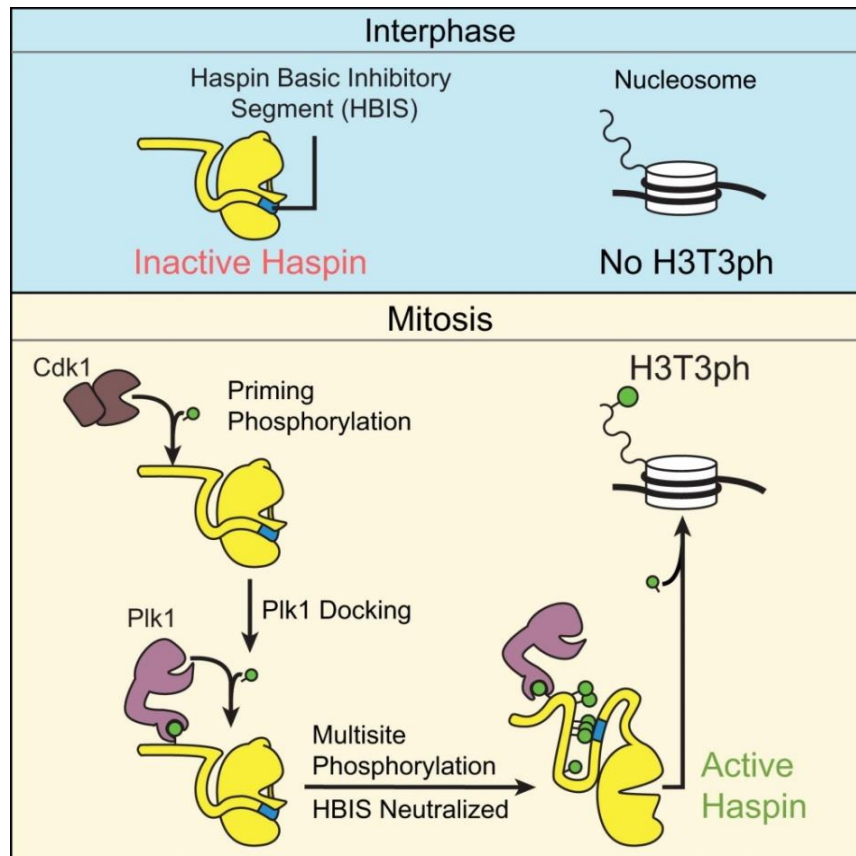
καθ' όλη την διάρκεια της μεσόφασης, έως την πρόφαση της επόμενης μιτωτικής διαίρεσης⁽⁹⁶⁾. Η πρόσδεση της ρυθμιστικής υπομονάδας RepoMan εμποδίζει την εξαπλωση της H3T3rh στα σκέλη των χρωμοσωμάτων από το μέσο της πρόφασης έως τη μετάφαση, συμβάλλοντας έτσι στη συμπύκνωση της χρωματίνης. Μέσω του ίδιου μηχανισμού (απο-φωσφορυλίωση της H3T3rh) συμμετέχει και στη στόχευση της Aurora B και κατά συνέπεια του CPC στα κεντρομερίδια και της MCAK στους κινήτοχώρους⁽⁹⁷⁾.

Η έναρξη της ανάφασης σηματοδοτεί μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Η CDK1 στρατολογεί την PP2A-B56, η οποία απο-φωσφορυλιώνει την RepoMan (στη S893). Στην συνέχεια, αυτή στοχεύει την PP1γ στα κεντρομερίδια, όπου απενεργοποιεί την Aurora B και τη Haspin, μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου (πρώιμη ανάφαση). Το σύμπλοκο PP1γ-RepoMan καταλύει επίσης την απο-φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 σε πολλαπλά κατάλοιπα. Πιο συγκεκριμένα, απο-φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 3 (άμεσα), τη θρεονίνη 11 (έμμεσα, διαμέσου της απενεργοποίησης της ATM), τη σερίνη 10 και τη σερίνη 28 κατά την πρώιμη ανάφαση. Η απο-φωσφορυλίωση της H3S28 οδηγεί στην εκ νέου πρόσδεση της HP1γ και την εγκαθίδρυση της H3K27me₃, υποβοηθώντας έτσι στην αποκατάσταση της ετεροχρωματίνης των μετα-μιτωτικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, μέσω του αμινο-τελικού της άκρου, η PP1γ στρατολογεί την Importin β και την Nup 153 στην περιφέρεια των χρωμοσωμάτων, όπου συμβάλλει στην ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου (όψιμη ανάφαση)^(62, 98- 101).

1.8.6. Η Haspin ρυθμίζει την πρόσδεση του CPC (chromosomal passenger complex) στα κεντρομερίδια

Η παρουσία της H3T3rh στα κεντρομερίδια, κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης, οδήγησε στην υπόθεση ότι ίσως αυτή να ρυθμίζει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Για τον σκοπό αυτό, η δραστικότητα της Haspin θα πρέπει να ελέγχεται χρονικά, ώστε να είναι περιορισμένη στη φάση της μίτωσης, παρά την συνεχή καταλυτική δραστικότητα του ενεργού της κέντρου.

Πράγματι, κατά την έναρξη της μίτωσης η Haspin φωσφορυλιώνεται από την CDK1 σε πολλαπλές θέσεις στο αμινο-τελικό της άκρο. Οι τροποποιήσεις αυτές δημιουργούν θέσεις αναγνώρισης για την κινάση Plk1 (PBD, Plk1 binding domain), η οποία φωσφορυλιώνει επίσης την Haspin. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται άρση της στερεοχημικής παρεμπόδισης που προκαλεί η αλληλεπίδραση του HBIS με το ενεργό της κέντρο κατά τη μεσόφαση. Έτσι, η Haspin είναι ικανή να αλληλεπιδρά με το υπόστρωμά της μόνο κατά τη διάρκεια της μίτωσης. (εικ. 22)^(83, 102, 103).

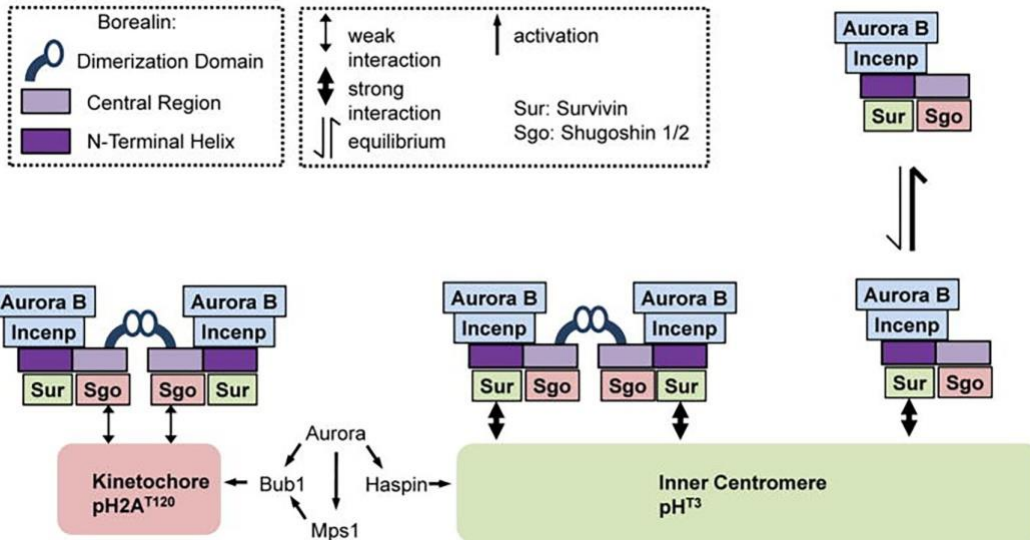


Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού ενεργοποίησης της Haspin διαμέσου των CDK1/PIK1⁽¹⁶⁾.

Συνηγορητικά προς την άποψη ότι η Haspin ρυθμίζει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μιτωτική διαίρεση λειτούργησε η αναγνώριση της πρόσδεσης του BIR domain της Survivin με την H3T3ph. Ο συσχετισμός αυτός ενεργοποιεί την Aurora B στα κεντρομερίδια, η οποία προσελκύει και τις υπόλοιπες υπομονάδες του CPC στην ίδια θέση^(104, 105).

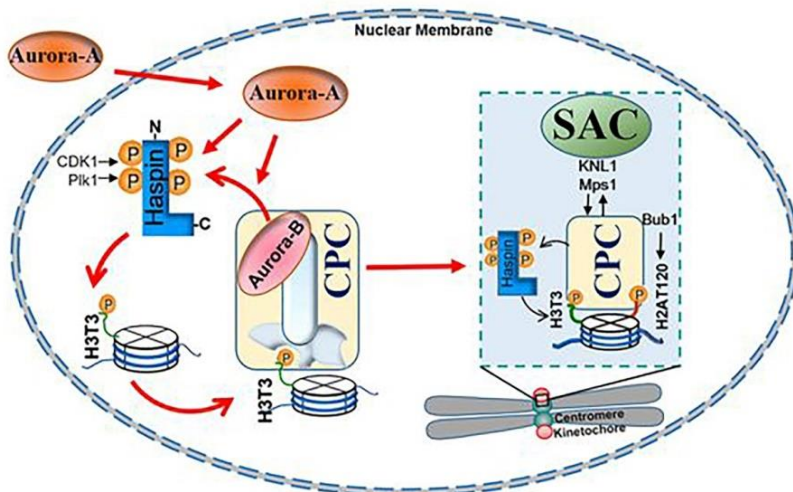
Ενεργοποιητικό σήμα για την πρόσκληση του CPC κατά την έναρξη της μίτωσης αποτελεί η διαμεσολαβούμενη από την PRMT6 H3R2me₂^{asym}. Η τροποποίηση αυτή λειτουργεί συνεργατικά με την H3T3ph για την τοποθέτηση του CPC στα κεντρομερίδια και τα σκέλη των χρωμοσωμάτων. Αρχικά, η Aurora B αναγνωρίζει την H3R2me₂^{asym} στα σκέλη των χρωμοσωμάτων, όπου φωσφορυλιώνει την H3S10, συμβάλλοντας έτσι στην ολοκλήρωση της συμπύκνωσής τους. Στις ίδιες θέσεις εντοπίζεται και η υπομονάδα τοποθέτησης του CPC, η οποία μεταπηδά στα κεντρομερίδια, μετά την εγκατάσταση της Haspin και της H3T3ph⁽¹⁰⁶⁾.

Η πρόσδεση στα κεντρομερίδια ισχυροποιείται μετά από διμερισμό του συμπλόκου (εικ. 23). Πιο συγκεκριμένα, διαμέσου του διμερισμού της Borealin, δημιουργούνται δυο δεσμοί Survivin-H3T3ph, οι οποίοι ενισχύουν την πρόσδεση του CPC στο εσωτερικό των κεντρομεριδίων⁽¹⁰⁷⁾.



Εικόνα 23. Ο διμερισμός του CPC ενισχύει την αλληλεπίδραση με το κεντρομερίδιο. Η σύνδεση δύο ξεχωριστών υπομονάδων του CPC, μέσω της υποπεριοχής διμερισμού της Borealin, οδηγεί στη δημιουργία δύο δεσμών Survivin-H3T3rh. Στους κινητοχώρους το CPC ενισχύει τη σύνδεσή του μέσω δυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ της H2AT20rh και της Shugosin. Το μοντέλο βασίζεται στην ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του CPC με την H3T3rh και την H2AT20rh⁽¹⁰⁷⁾.

Επιπρόσθετα, η Aurora B και η Haspin φωσφορυλιώνουν η μία την άλλη δημιουργώντας έτσι ένα κύκλο ανατροφοδότησης, ο οποίος ενισχύει το σήμα ενεργοποίησης κατά 20 φορές⁽¹⁰⁸⁾. Ο κύκλος αυτός ενισχύεται και από την κινάση Aurora A, η οποία φωσφορυλιώνει την Haspin στο όριο G₂/πρόφασης, συμμετέχοντας έτσι στην πρόσδεση του CPC στα κεντρομερίδια (εικ. 24)⁽¹⁰⁹⁾.



Εικόνα 24. Μοντέλο ανατροφοδότησης του κύκλου Aurora B-Haspin-H3T3rh-CPC από την κινάση Aurora A στην αρχή της μίτωσης⁽¹⁰⁹⁾.

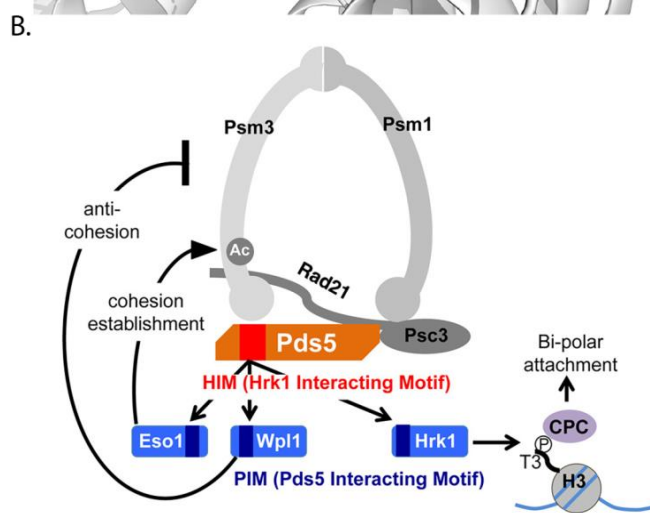
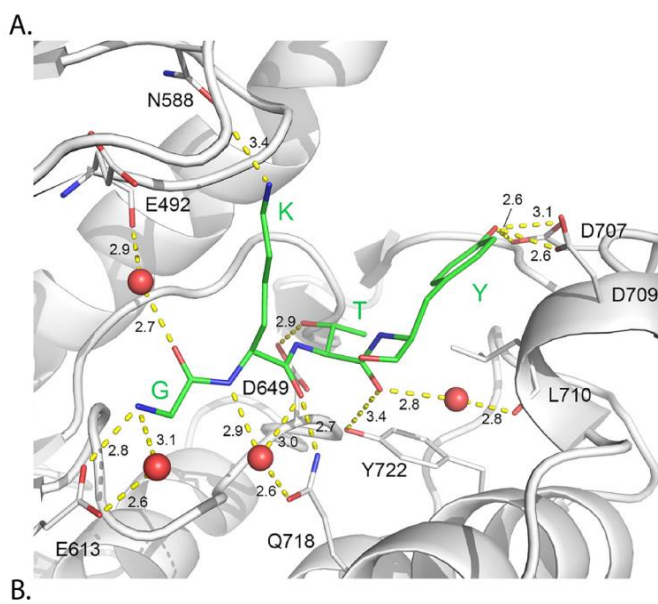
Η χρήση μικρομοριακών αναστολέων της Haspin (5-ITU, CHR-6494) ενισχύει την παραπάνω άποψη. Εκτός από μείωση των επιπέδων της H3T3rh, οι αναστολείς αυτοί προκαλούν μερική απομάκρυνση της Aurora B (και κατά συνέπεια του CPC) από τα κεντρομερίδια και σε μικρότερο βαθμό από τους κινητοχώρους. Έτσι, δημιουργούνται προβλήματα στον προσανατολισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του SAC, το οποίο όμως πολλές φορές παρακάμπτεται⁽¹¹⁰⁻¹¹⁵⁾.

Ωστόσο, η Haspin δεν είναι απαραίτητη για την πλήρη δραστικότητα του CPC. Τόσο σε κύτταρα ζύμης, όσο και στον άνθρωπο μια ακόμα μιτωτική κινάση, με καταλυτικά ενεργό κέντρο καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, συμμετέχει στη στόχευση του CPC στα κεντρομερίδια. Η κινάση Bub1 προσελκύεται στα κεντρομερίδια από την Mps1 και φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2A (T120 για τον άνθρωπο και S121 για το fission yeast) κατά την πρόφαση της μίτωσης. Αυτό οδηγεί με τη σειρά του στην πρόσδεση της Borealin με την H2A, διαμέσου της sgo1/2⁽¹¹⁶⁻¹²⁰⁾. Ταυτόχρονα, η Bub1 προσδένεται στους κινητοχώρους, όπου και φωσφορυλιώνεται από την κινάση Knl1, προωθώντας έτσι την εγκαθίδρυση του CPC και σε αυτές τις θέσεις μέσω της αλληλεπίδρασης H2AT120rh-sgo1/2-Borealin⁽¹²¹⁾. Τόσο η Bub1, όσο και η Haspin έχουν την δυνατότητα να προσελκύσουν ανεξάρτητα την κινάση Aurora B στις θέσεις όπου αυτές βρίσκονται. Η προσέλκυση του CPC μέσω της H2AT120rh-Aurora B είναι δυνατό να αναπληρώσει την έλλειψη της αλληλεπίδρασης H3T3rh-Survivin και να διορθώσει τυχόν λάθη στη πρόσδεση των κινητοχώρων με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου⁽¹²²⁾ και συνεπώς να ολοκληρώσει τη μιτωτική διαίρεση. Ο εφεδρικός αυτός μηχανισμός καθίσταται λειτουργικός εξαιτίας του χωρικού διαχωρισμού (spatial separation) των διαφόρων υποπληθυσμών της Aurora B. Στο εσωτερικό των κεντρομεριδίων συναντάται ο εξαρτώμενος από την Haspin-H3T3rh-Survivin πληθυσμός, στο εξωτερικό (κοντά στους κινητοχώρους ο εξαρτώμενος από την Bub1-H2AT120rh-sgo1 και τέλος 20nm εξωτερικά της CenpC (εσωτερικά των κινητοχώρων) ένας τρίτος πληθυσμός. Σε περίπτωση απουσίας του πρώτου, η sgo1 που προέρχεται από τον δεύτερο μεταπηδά διαδοχικά από τους κινητοχώρους, στα κεντρομερίδια και ενεργοποιεί την Aurora B. Η διαδικασία αυτή είναι πιθανό να συμπεριλαμβάνει και την «χαλάρωση» της περικεντρομεριδιακής ετεροχρωματίνης από την RNA πολυμεράση II^(123, 124). Ο μηχανισμός αυτός αφορά μόνο τα κεντρομερίδια, αφού απουσία της Haspin και της Bub1 τα υποστρώματα της Aurora B στους κινητοχώρους (Hec1, Dsn1 και Knl1) φωσφορυλιώνονται επαρκώς και ο μηχανισμός ελέγχου (mitotic checkpoint) ικανοποιείται⁽¹²⁵⁾.

1.8.7. Η Haspin είναι υπεύθυνη για την κεντρομεριδιακή συνοχή και την προστασία των αδελφών χρωματίδων από πρόωρη απελευθέρωση

Σε κύτταρα RPE1 και U2OS, η Haspin βρέθηκε να σχετίζεται με τη χρωματίνη ακόμα και μετά την έναρξη της ανάφασης, ενώ συνεντοπίζεται και με τον παράγοντα Pds5B^(121, 126). Επιπλέον, η έλλειψη του *scc1* σε κύτταρα ζύμης οδήγησε σε διασπορά της H3T3ph στα σκέλη των χρωμοσωμάτων⁽¹¹⁶⁾.

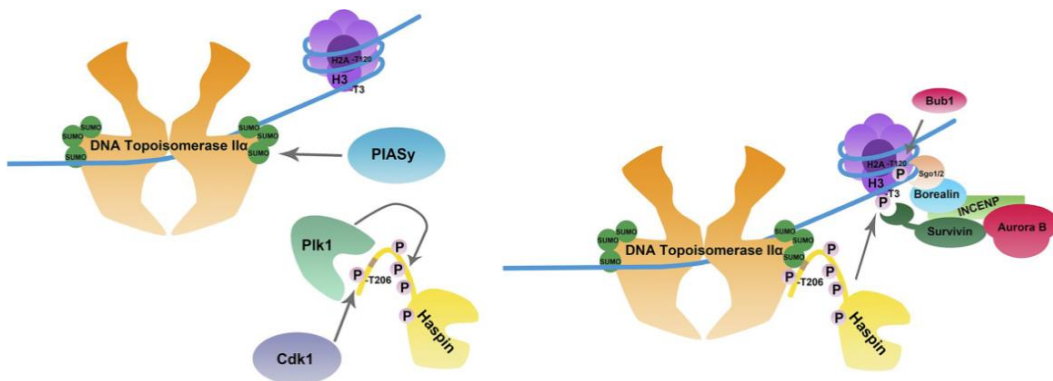
Η πρόσδεση του παράγοντα Wapl στον Pds5B, διαμέσου του μοτίβου YSR της Haspin, απελευθερώνει το σύμπλοκο της cohesin από τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων κατά την πρόφαση της μίτωσης. Παρόλα αυτά, η κεντρομεριδιακή συνοχή προστατεύεται μέχρι την έναρξη της ανάφασης με δύο τρόπους. Αρχικά, η κινάση Aurora B φωσφορυλιώνει την RepoMan στη σερίνη 893⁽¹²⁷⁾. Στη συνέχεια, το καρβοξυτελικό άκρο της Haspin προσδένεται και φωσφορυλιώνει το YSR μοτίβο του Wapl. Με τον τρόπο αυτό, αναστέλλει άμεσα την πρόσδεσή του με τον Pds5B (εικ. 25^A)⁽¹²⁸⁾.



Εικόνα 25. Η Haspin απενεργοποιεί τον παράγοντα Wapl, προσδένεται στον Pds5B και προστατεύει τα κεντρομερίδια από πρόωρο διαχωρισμό. **(A)** Μοντέλο αλληλεπίδρασης της Haspin (γκρι) με τον Wapl (πράσινο). Τα μόρια νερού σημειώνονται με κόκκινες σφαίρες. Εικόνα τροποποιημένη από Liang et al., 2018⁽¹²⁸⁾. **(B)** Η υπομονάδα Pds5B καθορίζει την πορεία εγκατάστασης του συμπλόκου της cohesin στη χρωματίνη και/είτε τον προσανατολισμό των χρωμοσωμάτων, ανάλογα με το ρυθμιστικό παράγοντα που αλληλεπιδρά με το μοτίβο HIM (π.χ. Wapl/Wpl1, Eso1, Haspin/Hrk1). Εικόνα τροποποιημένη από Goto et al., 2017⁽¹²⁹⁾

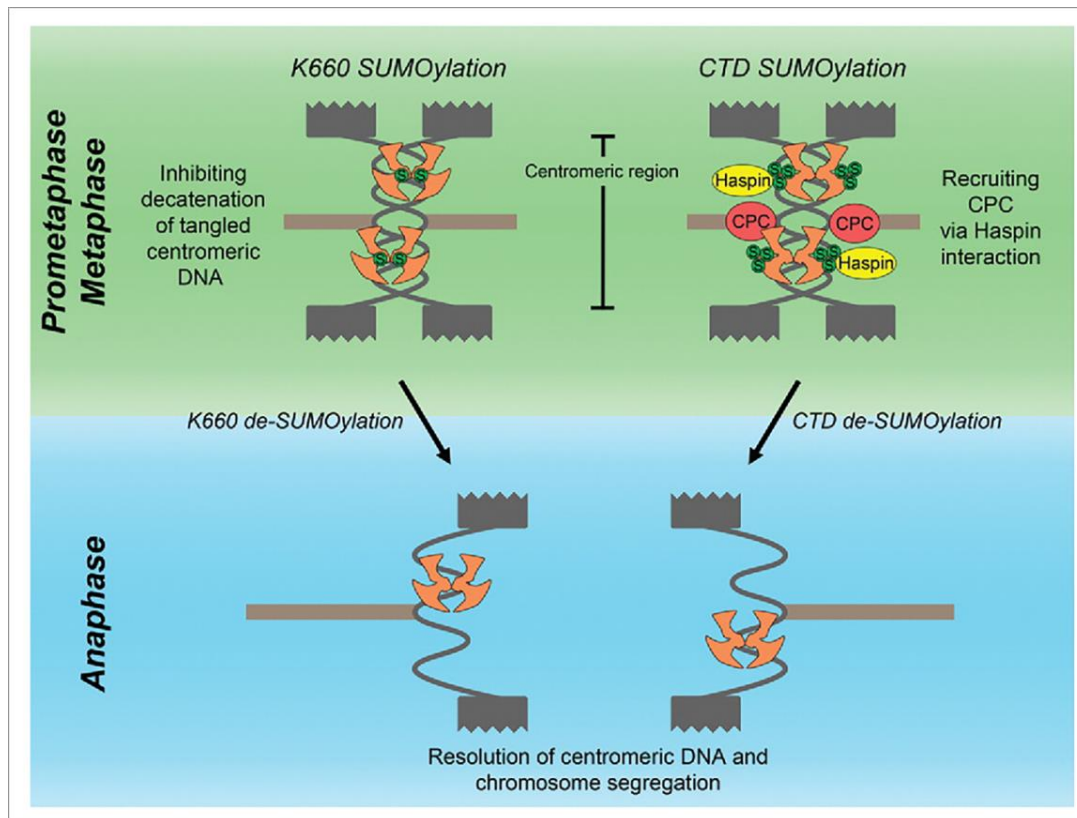
Επιπρόσθετα, η Haspin προσδένεται στον Pds5B, διαμέσου του μοτίβου RTYGA (Pds5B interacting motif, PIM) στο άμινο-τελικό της άκρο. Συνεπώς, ο ανταγωνισμός της Haspin με τον παράγοντα Wapl για την ίδια θέση πρόσδεσης στον Pds5B (HIM, Haspin/Hrk1 interacting motif) συνεισφέρει στην προστασία της κεντρομεριδιακής συνοχής (εικ. 25^B)^(82, 129).

Ένας δεύτερος τρόπος πρόσδεσης της Haspin στα κεντρομερίδια υποδεικνύει τη σημασία της στην προστασία της συνοχής. Σε κύτταρα ζύμης, στο *X. laevis* αλλά και στον άνθρωπο, η Haspin αλληλεπιδρά με τα κεντρομερίδια δια μέσου της topoisomerase IIα. Το ένζυμο αυτό προσδένεται σε ειδικές θέσεις κατά τη μεσόφαση και ξεδιπλώνει τις αλυσίδες του DNA, στις φάσεις S και G2. Επιπλέον, ρυθμίζει την ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints). Μετακινείται στα κεντρομερίδια στην αρχή της μίτωσης, όπου ρυθμίζει την πρόσδεση του CPC^(130, 131). Το καρβοξυ-τελικό άκρο της topoisomerase IIα (topIIα-CTD) διαθέτει 5 συντηρημένες θέσεις σουμούλιωσης, διακριτές από το καταλυτικό της κέντρο. Η σουμούλιωση της topoisomerase IIα λαμβάνει χώρα κατά τη μίτωση. Η Haspin με την σειρά της έχει δυο sumo-interacting motifs (SIM's) στο αμινο-τελικό της άκρο (aa 343-346 & 364-367 στο *X. laevis*). Πειραματικά δεδομένα προερχόμενα από μитωτικά κύτταρα, έδειξαν ότι η Haspin προσδένεται ισχυρά στο σουμούλιωμένο καρβοξυ-τελικό άκρο της topoisomerase IIα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η Haspin φωσφορυλιώνεται από το sumo-topIIα-CTD (T206 για το *X. laevis* και T128 για τον *H. sapiens*) στα κεντρομερίδια και ως αποτέλεσμα, η H3T3rh προσελκύει το CPC στο σημείο αυτό (εικ. 26).



Εικόνα 26. Αναπαράσταση του μοντέλου στρατολόγησης της Haspin στα κεντρομερίδια από την topoisomerase IIα. **(A)** Η κεντρομεριδιακή topoisomerase IIα σουμούλιώνεται (S), στο καρβοξυ-τελικό της άκρο από την SUMO E3 ligase PIASy. Την ίδια στιγμή, η Haspin φωσφορυλιώνεται (P) από την Cdk1 στη T206. Η PIK1 προσδένεται στη θέση αυτή και ενεργοποιεί την Haspin μέσω φωσφορυλίωσης. Η sumo-topIIα στη συνέχεια προσελκύει την Haspin στα κεντρομερίδια και η H3T3rh προσελκύει το CPC. Παράλληλα, η κινάση Bub1 φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2A στη T120 και προσελκύει περισσότερα σύμπλοκα του CPC διαμέσου της αλληλεπίδρασης shugoshin 1/2 (sgo1/2)-Borealin⁽¹³¹⁾.

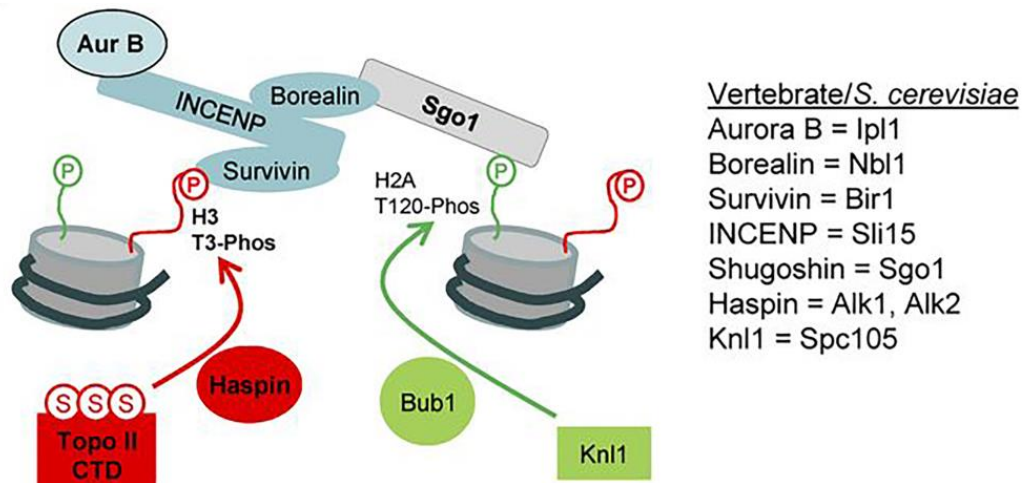
Η σουμοϋλίωση της topoisomerase IIα στην K660 αναστέλλει τη δραστικότητα του ενζύμου στα πρώιμα στάδια της πρόφασης, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην προστασία της συνοχής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Στην αρχή της ανάφασης, η topoisomerase IIα απο-φωσφορυλιώνεται σε όλες τις θέσεις με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της H3T3rh από τα κεντρομερίδια και την έναρξη του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων (εικ. 27)^(131, 132).



Εικόνα 27. Ο διπλός ρόλος της σουμοϋλίωσης της topoisomerase IIα κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης. Από τη μια πλευρά, η K660sumo αναστέλλει τη λειτουργία της topIIα στην αρχή της μιτωτικής διαίρεσης, υποβοηθώντας την προστασία της κεντρομεριδιακής συνοχής. Από την άλλη, το sumo-topIIα-CTD ρυθμίζει τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση διαμέσου των Haspin-H3T3rh-CPC. Στην ανάφαση, η topoisomerase IIα απο-σουμοϋλιώνεται σε όλες τις θέσεις (κατάλοιπα λυσίνης). Με τον τρόπο αυτό, διαχωρίζεται η κεντρομεριδιακή χρωματίνη και οι αδελφές χρωματίδες από την άτρακτο⁽¹³²⁾.

Παρά τα παραπάνω στοιχεία, ο ρόλος της Haspin στην προστασία της συνοχής δεν είναι απόλυτος. Η topoisomerase IIα προσελκύει και την sgo1 στα κεντρομερίδια (κύτταρα ζύμης), συμμετέχοντας έτσι στην ενεργοποίηση του δεύτερου μηχανισμού που περιγράφηκε παραπάνω (H2AT120rh-sgo1/2-Borealin) (εικ. 28). Η sgo1 προσδένεται στην PP2A και προωθεί τη συσσώρευση των Haspin-H3T3rh στα κεντρομερίδια. Η απομάκρυνση της sgo1 από τις θέσεις αυτές, σε κύτταρα HeLa οδηγεί σε μερικό

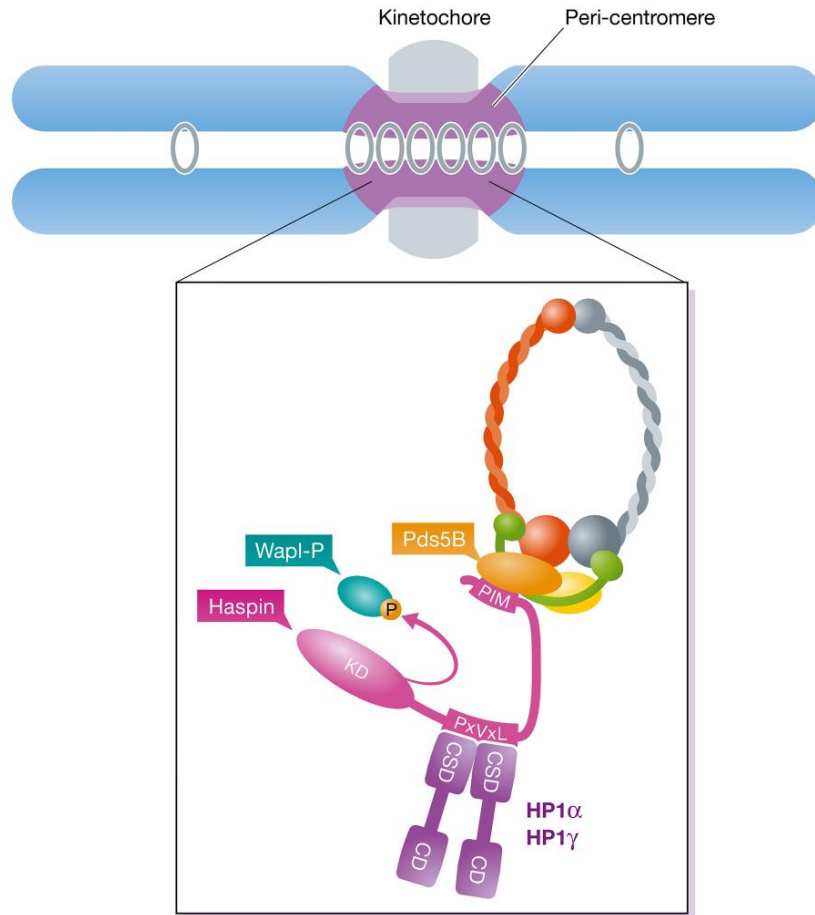
εκτοπισμό του CPC, προβλήματα στη συνοχή και μη ορθό διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων⁽¹³³⁾. Είναι λοιπόν προφανές πως οι H3T3ph/H2AT120ph δρουν παράλληλα⁽¹³⁰⁾.



Εικόνα 28. Η εγκαθίδρυση και η ενεργοποίηση του CPC στα κεντρομερίδια δεν είναι αποκλειστική αρμοδιότητα της Haspin στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στο κλειδί εμφανίζονται τα ορθόλογα των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών μεταξύ των σπονδυλωτών και του ζυμομύκητα *S. cerevisiae*⁽¹³⁰⁾.

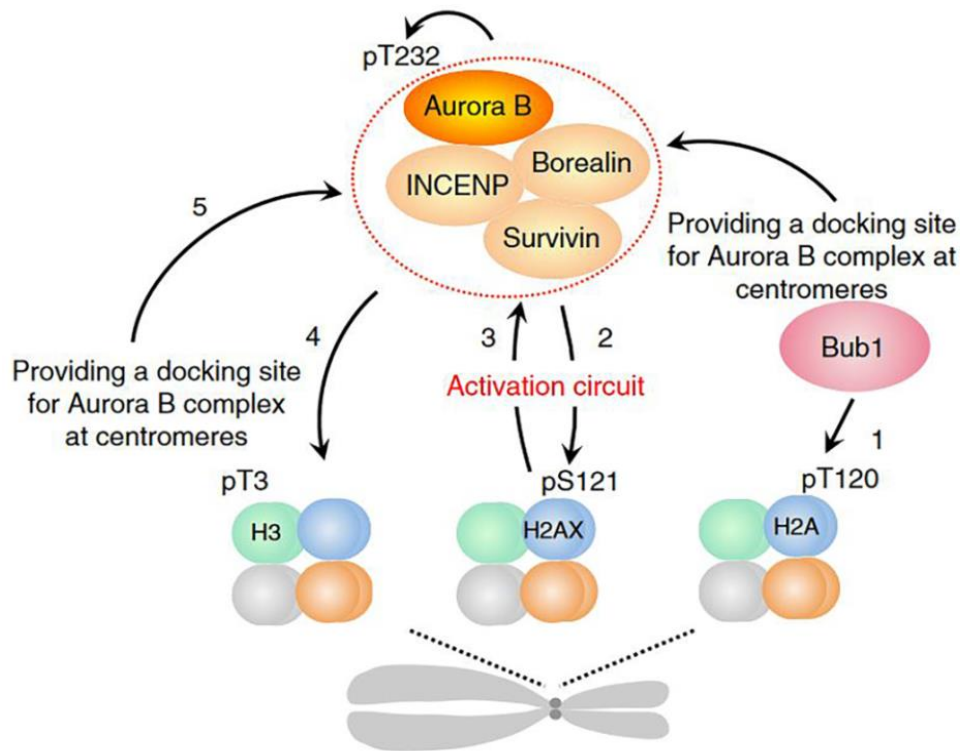
Η παραπάνω υπόθεση υποστηρίζεται και από την αλληλεπίδραση μεταξύ INCENP-HP1α/γ. Όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου, η Aurora B καταλύει τη φωσφορυλίωση της H3S10 στην περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, όπου λαμβάνει χώρα ο διπλασιασμός των κεντρομεριδίων. Στην πρόφαση, η H3S10ph εντοπίζεται στην περιφέρεια των χρωμοσωμάτων, όπου ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση της CenpA στους κινητοχώρους⁽¹³⁴⁾. Το καρβοξυ-τελικό άκρο (CSD) των HP1α/γ αναγνωρίζει το μοτίβο PVEET της INCENP και προσδένεται σε αυτό, πριν τη φωσφορυλίωση της H3S10. Έχει προταθεί πως μέσω του ίδιου μοτίβου (PxVxL) η Haspin συνδέεται άμεσα με την HP1 και οδηγείται στη φωσφορυλίωση του Wapl και την πρόσδεση στον Pds5B (εικ. 29). Η δράση αυτή είναι σημαντική καθώς συμβάλει στον κύκλο ανατροφοδότησης μεταξύ Haspin και Aurora B, προωθώντας την κεντρομεριδιακή συνοχή και την πρόληψη του μη-διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων^(135- 137).

Συμπληρωματικά προς τα παραπάνω, η αυτό-φωσφορυλίωση της Bub1, στην T589, ρυθμίζει τη δέσμευση των H2AT120ph και sgo1 στους κινητοχώρους. Αναστολή της καταλυτικής της δραστηριότητας επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης της sgo1 με τη χρωματίνη. Είναι λοιπόν προφανές πως η Haspin δρα παράλληλα με τις Bub1 και sgo1 για την προστασία της συνοχής^(138, 139).



Εικόνα 29. Οι ετεροχρωματικές πρωτεΐνες α και γ (HP1α/γ) συμμετέχουν στην προσέλκυση της Haspin στα κεντρομερίδια. Η διπλή αλληλεπίδραση, μέσω των μοτίβων PxVxL και PIM, στο αμινο-τελικό άκρο της υπό μελέτη κινάσης ενισχύεται από τη φωσφορυλίωση του παράγοντα Wapl, από το καρβοξυ-τελικό της άκρο⁽¹³⁷⁾.

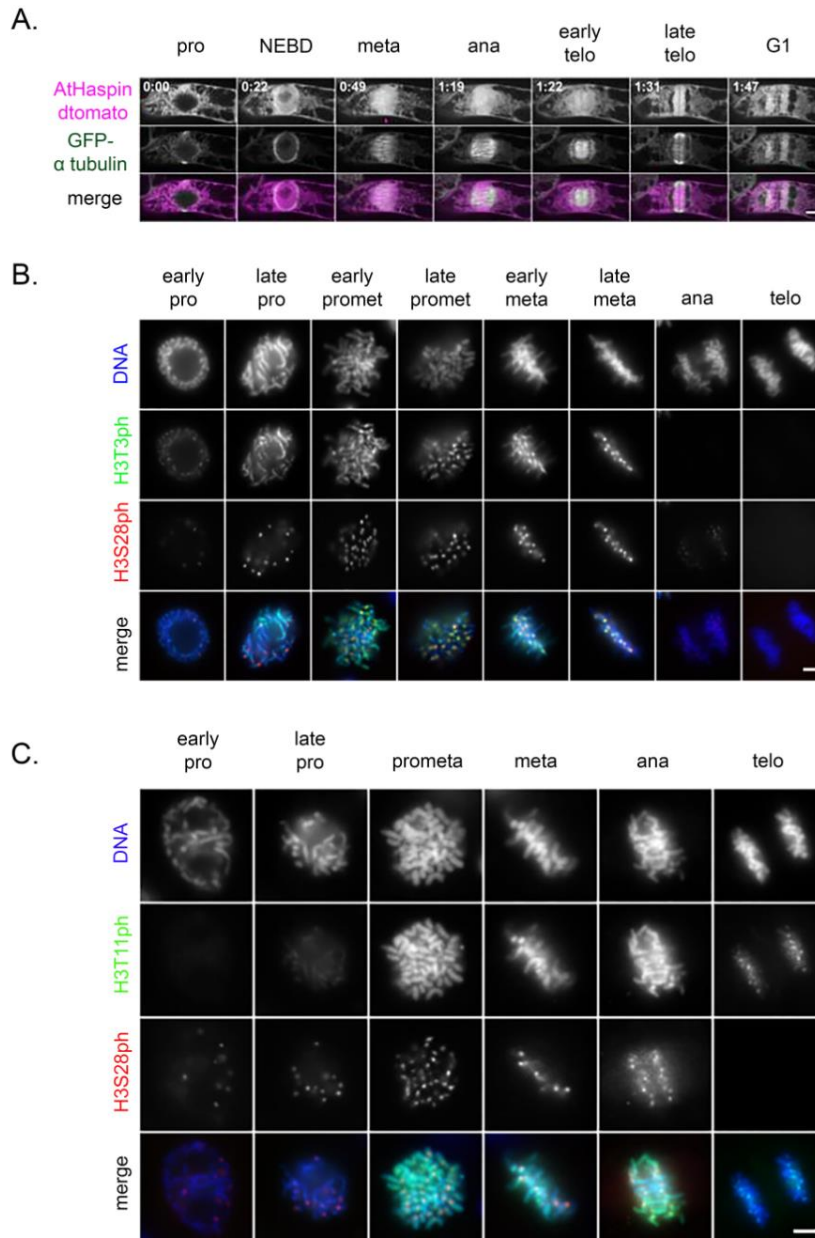
Αντίθετα, η προσέλκυση του CPC στα κεντρομερίδια ανεξάρτητα από τη Haspin, συνηγορεί προς την άποψη ότι ίσως ο ρόλος της στην ολοκλήρωση της μιτωτικής διαίρεσης να είναι λιγότερο καθοριστικός από ότι έχει δειχθεί μέχρι τώρα. Στο μονοπάτι αυτό, η μερικώς ενεργοποιημένη Aurora B φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2A.x (στην S121) οδηγώντας σε περαιτέρω ενεργοποίησή της στα κεντρομερίδια. Η ταυτόχρονη παρουσία της Plk1 στους κινητοχώρους ολοκληρώνει τον κύκλο και ανατροφοδοτεί την ενεργοποίηση της Aurora B. Έτσι ικανοποιείται το SAC, καθώς οι κινητοχώροι είναι σωστά προσδεμένοι στα κεντρομερίδια αλλά και στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου (εικ. 30)⁽¹⁴⁰⁻¹⁴³⁾.



Εικόνα 30. Το κύκλωμα ενεργοποίησης της Aurora B και του CPC λειτουργεί ανεξάρτητα από τη Haspin. **(1)** Η Bub1-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της H2AT120 προκαλεί την προσέλκυση του CPC στα κεντρομερίδια. **(2)** Η μερικώς ενεργοποιημένη Aurora B καταλύει τη φωσφορυλίωση της H2A.x, στην S121. **(3)** Αυτό καταλήγει στην ανατροφοδότηση της ενεργοποίησης της Aurora B και της Haspin στο εσωτερικό των κεντρομεριδίων και ρυθμίζει την εγκατάσταση περισσότερων μονάδων του συμπλόκου CPC, διαμέσου της H3T3ph-Survivin⁽¹⁴⁰⁾.

1.8.8. Η Haspin στα φυτά

Στον οργανισμό *A. thaliana*, η Haspin καταλύει τη φωσφορυλίωση της H3T3, ενώ είναι ικανή να φωσφορυλιώσει και την H3T11 *in vitro*. Αντίθετα με ότι συμβαίνει στον άνθρωπο και το ποντίκι, κατά τη μεσόφαση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Εντοπίζεται στα χρωμοσώματα κατά την προμετάφαση/μετάφαση της μίτωσης και στη μέση πλάκα (cell plate) κατά την κυττοκίνηση (εικ. 31^A). Σε κύτταρα BY-2 η θέση της Haspin συμπίπτει με αυτή των H3T3ph και H3T11ph (εικ. 31^B). Έκτοπη έκφραση της AtHaspin-GFP, σε φυτά *Arabidopsis*, έδειξε πως εντοπίζεται σε μεριστωματικούς ιστούς, οι οποίοι έχουν υψηλή μιτωτική δραστηριότητα και σε εμβρυικούς ιστούς (one-cell stage to four-cell stage). Συνεπώς, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της υπέδειξε μια έμμεση σχέση της AtHaspin με την οργανογένεση (εκβλάστηση ριζών, μίσχων κτλ)⁽¹⁴⁴⁾.



Εικόνα 31. Υποκυτταρικός εντοπισμός της AtHaspin. **(A)** Παρατήρηση κυττάρων BY-2 που εκφράζουν GFP- α Tubulin και AtHaspin-dtomato σε πραγματικό χρόνο. **(B)** Κατανομή της H3T3ph (πράσινο) και της H3S28ph (κόκκινο) σε κύτταρα BY-2 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Χρώση του DNA με Dapi. **(C)** Κατανομή της H3T11ph (πράσινο) και της H3S28ph (κόκκινο) σε κύτταρα BY-2 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Χρώση του DNA με Dapi. Scale bars: 10 μ m. Pro (prophase): πρόφαση, NEBD (Nuclear Envelope Break Down): διάσπαση του πυρηνικού φακέλου, meta (metaphase): μετάφαση, ana (anaphase): ανάφαση, early telo (early telophase): πρώιμη τελόφαση, late telo (late telophase): όψιμη τελόφαση, early pro (early prophase): πρώιμη πρόφαση, late pro (late prophase): όψιμη πρόφαση, early promet (early prometaphase): πρώιμη προμετάφαση, late promet (early prometaphase): όψιμη προμετάφαση, early meta (metaphase): πρώιμη μετάφαση, late meta (metaphase): όψιμη μετάφαση, telo (telophase): τελόφαση, prometa (prometaphase): προμετάφαση. Εικόνα τροποποιημένη από Kurihara et al., 2011⁽¹⁴⁴⁾.

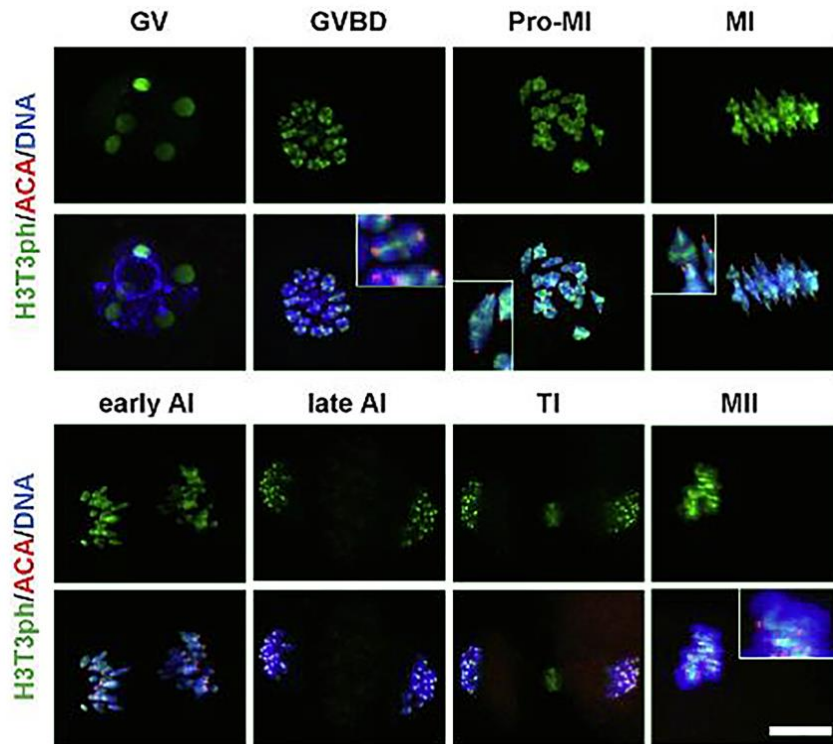
Όμοια με τους ζωικούς οργανισμούς, η Haspin στα φυτά ρυθμίζει την προσέλκυση της κινάσης Aurora 3 (ομόλογη της Aurora B στα ζώα και τον άνθρωπο) στα κεντρομερίδια. Φαρμακολογική αναστολή της σε κύτταρα BY-2 οδήγησε σε προβλήματα

κατά την κυττοκίνηση, τα οποία δημιουργήσαν διπύρρηνα κύτταρα, με μερικώς σχηματισμένη μέση πλάκα και μεταβολές στην κατανομή των ινιδίων ακτίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας της Haspin στα φυτά, με τη χρήση του 5-ITU, προκαλεί ολοκληρωτική απώλεια της Aurora 3 από τα κεντρομερίδια⁽¹⁴⁵⁾. Αντίστοιχη αναστολή σε κύτταρα ποντικού προκαλεί μερική μόνο διασπορά της Aurora B στα σκέλη των χρωμοσωμάτων⁽¹²⁾.

1.8.9. Η Haspin στα ωκύτταρα

Η Haspin στα ωκύτταρα ελέγχει την επανεκκίνηση των μειωτικών διαιρέσεων, την ορθή μετάβαση από την πρώτη στη δεύτερη μειωτική διαίρεση και το σωστό εντοπισμό των Aurora C-CPC στο διαμήκη άξονα των αδελφών χρωματίδων (interchromatid axis, ICA). Στα μειωτικά κύτταρα, το CPC αποτελείται εκτός από τις Aurora B, INCENP, Borealin και Survivin και από την κινάση Aurora C. Η τελευταία ρυθμίζει τη λειτουργικότητα του CPC, την ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων και την πρόσδεση των κινητοχώρων με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου κατά τη μετάφαση I. Ενεργοποιητικό σήμα για την απόθεση της H3T3ph που είναι υπεύθυνη για τη συμπύκνωση των μειωτικών χρωμοσωμάτων και τον ακριβή διαχωρισμό τους αποτελεί η CFP1-εξαρτώμενη H3K4me₃.

Η παρουσία της H3T3ph ανιχνεύτηκε από τη μετάφαση I έως την ανάφαση I και κατά τη μετάφαση II, όπως και η Haspin (εικ. 32). Ειδικότερα, κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση εντοπίστηκε στα κεντρομερίδια και στον διαμήκη άξονα μεταξύ των χρωμοσωμάτων. Η αναστολή της καταλυτικής της δραστηριότητας, μέσω του 5-ITU, προκάλεσε προβλήματα στην πρόοδο της μειωτικής διαίρεσης και εκτοπισμό των Aurora C-CPC από τον ICA. Ακόμη, οδήγησε σε δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων και των κέντρων οργάνωσης των μικροσωληνίσκων, μη κανονικό διαχωρισμό και ανευπλοειδία. Οι αλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος των μειωτικών χρωμοσωμάτων συνοδευόταν από μείωση των επιπέδων της υπομονάδας smc2, του condensin complex, αλλά όχι των υπομονάδων της cohesin sgo12 και rec8^(78, 146-150).



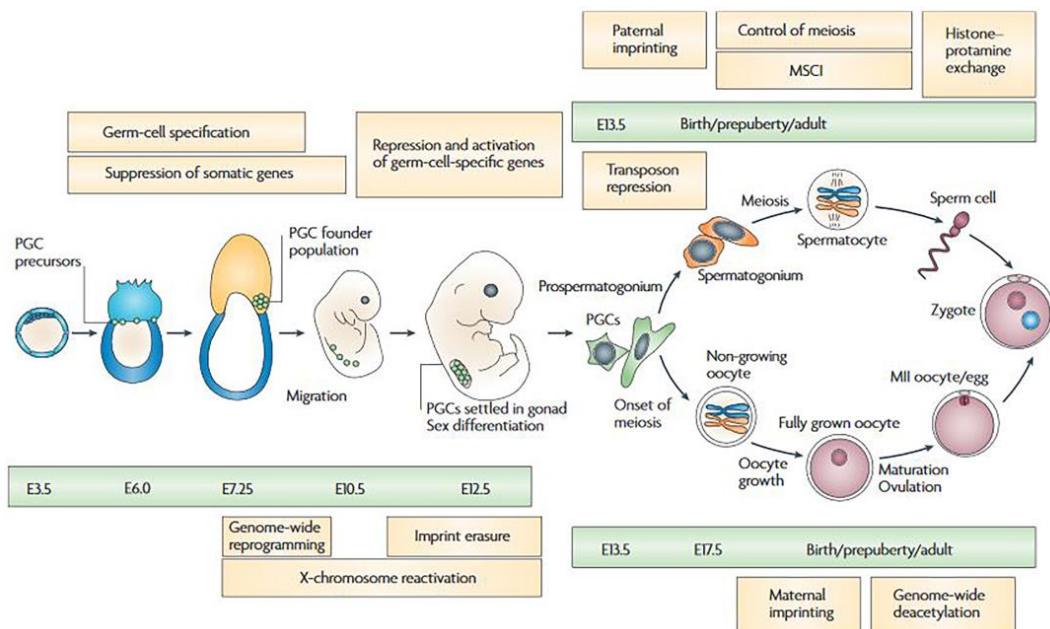
Εικόνα 32. Έκφραση και υποκυτταρικός εντοπισμός της H3T3ph (πράσινο) σε διάφορα στάδια της μειωτικής διαίρεσης των ωοκυττάρων. GV: Germinal Vesicle, GVBD: Germinal Vesicle Break Down, Pro-MI: Prometaphase I, MI: Metaphase I, early AI: early Anaphase I, late AI: late Anaphase I, TI: Telophase I, MII: Metaphase II. Εικόνα τροποποιημένη από Kang et al., 2015⁽¹⁴⁷⁾.

1.9. Η σπερματογένεση στο ποντίκι είναι μια στενά ελεγχόμενη διαδικασία

Η γαμετογένεση στο ποντίκι, όπως και στον άνθρωπο, ξεκινά κατά την εμβρυογένεση. Τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα (primordial germ cells, PGC's) προέρχονται από ένα πληθυσμό πολυδύναμων κυττάρων της επιβλάστης και έχουν μεσοδερματική προέλευση. Μια ομάδα 20 τέτοιων κυττάρων πρωτοεμφανίζεται κατά την ημέρα 7.25 της εμβρυογένεσης, ενώ η επαγωγή της τύχης τους γίνεται πολύ νωρίτερα από ειδικά σηματοδοτικά μόρια εξωδερματικής προέλευσης (Prdm1 E3.5, Blimp1 E6.0). Τα μόρια αυτά περιορίζουν την έκφραση σωματικών γονιδίων και προετοιμάζουν την έκφραση των γαμετικών μέσω μεταγραφικής ρύθμισης (RNA polymerase II) και τροποποιήσεων μεθυλίωσης (H3K9me_{1/2}, H3K27me₃, 5'meC). Η παρουσία των παραγόντων BMP4 (bone morphogenetic protein 4) και BMP8b (bone morphogenetic protein 8b) οριστικοποιεί την τύχη των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων (PGC specification) μέσω επαγωγής της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.

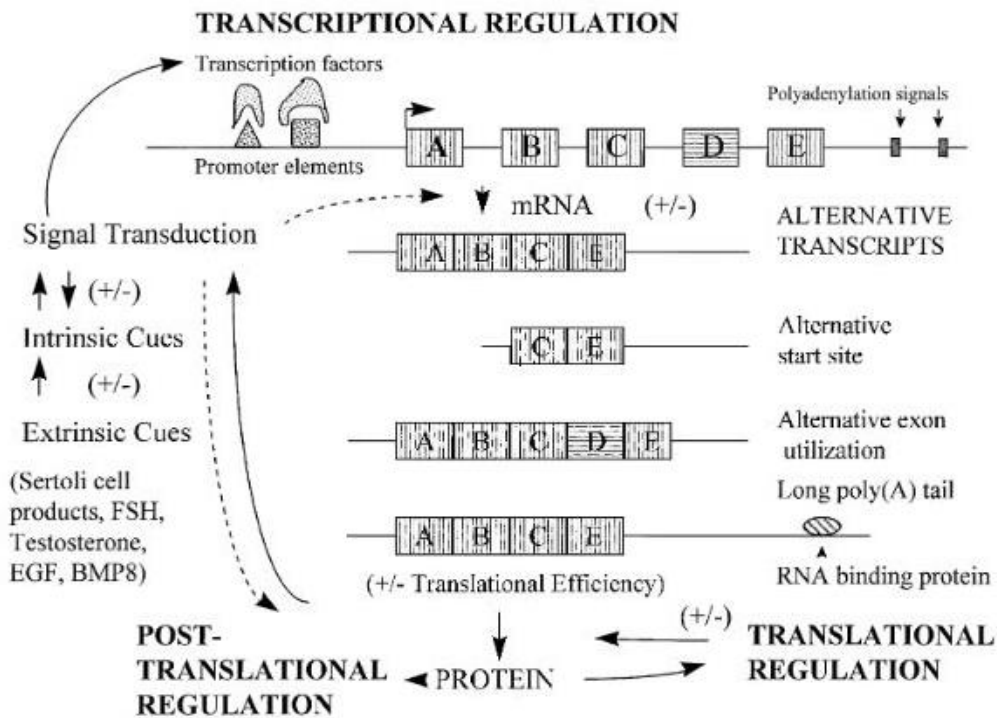
Κατά την ημέρα 8.5, ο ιδρυτικός πληθυσμός (PGC founder population) μεταναστεύει κατά μήκος του μεσεντέριου (midgut, E10.5), ενώ ταυτόχρονα διαφοροποιείται και εγκαθίσταται τελικά στις γεννητικές ακρολοφίες κατά την ημέρα 12.5. Η περίοδος αυτή χαρακτηρίζεται από διαγραφή της μεθυλίωσης και την εγκατάσταση αμφίσημων τροποποιήσεων στους υποκινητές ειδικών για τη σπερματογένεση γονιδίων (H3K4me₃/H3K27me₃). Μετά την εγκατάσταση στις γονάδες επάγεται η έκφραση ορισμένων τέτοιων γονιδίων (π.χ. DDX4, SYCP3, DAZL). Στη συνέχεια, τα κύτταρα διαιρούνται μιτωτικά και διαφοροποιούνται σε γαμετικά βλαστικά κύτταρα (germline stem cells, GCS's), μέσω ενεργοποίησης ειδικών σηματοδοτικών οδών (π.χ. FGF signaling, GDNF signaling, MEK/ERK and PI3K/Akt). Ορισμένα, θα παραμείνουν στην κατάσταση αυτή, ενώ άλλα θα εισέλθουν στην πρόφαση της μείωσης (E13.5).

Η παραγωγή ρετινοϊκού οξέος από τους γειτονικούς μεσονεφρούς (mesonephroi) διεγείρει την έκφραση των γονιδίων STRA8 και DAZL στα σπερματογόνια, τα οποία θα διαφοροποιηθούν και θα ξεκινήσουν να διαιρούνται μειωτικά. Παράλληλα, πραγματοποιείται de novo μεθυλίωση, κατά τα πατρικά πρότυπα (paternal imprinting). Τα πρόδρομα γαμετοκύτταρα του όρχεως παύουν να διαιρούνται μιτωτικά από το σημείο αυτό έως τη γέννηση. Στην εικόνα 33 παρουσιάζονται τα βασικά σημεία της διαφοροποίησης των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων, μαζί με τα επιγενετικά γεγονότα που τα χαρακτηρίζουν⁽¹⁵¹⁻¹⁵⁶⁾.



Εικόνα 33. Η πορεία της πρώιμης γαμετογένεσης στο ποντίκι και τα βασικά επιγενετικά γεγονότα που τη χαρακτηρίζουν. Διακρίνεται η χρονολογική σειρά από την εμφάνιση των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων στο έμβρυο (E6.0) έως την ενήλικη ζωή⁽¹⁵⁴⁾.

Ο έλεγχος της πορείας της σπερματογένεσης πραγματοποιείται με δυο τρόπους: τα ενδογενή και τα εξωγενή σήματα (εικ. 34). Τα ενδογενή σήματα ρυθμίζουν την εναλλαγή μεταξύ έκφρασης ειδικών για τη σπερματογένεση (γαμετικό πρόγραμμα) και μη (σωματικό πρόγραμμα) γονιδίων μέσω μεταγραφικού ελέγχου (γενικοί και ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες), μεταφραστικού ελέγχου (διάρκεια ζωής, εναλλακτική κατανομή και αποθήκευση mRNA) και εναλλακτικών μεταγράφων (διαφορετικές ισομορφές παράγονται είτε από διαφορετικές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, είτε από εναλλακτικό μάτισμα). Στα εξωγενή σήματα συμπεριλαμβάνεται η ορμονική ρύθμιση από τα γειτονικά σωματικά κύτταρα (παραγωγή τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig, υποδοχείς θυλακιοτρόπου ορμόνης FSH στα κύτταρα Sertoli), η ρύθμιση από εξωγενείς παράγοντες μέσω διαφορετικών υποδοχέων (π.χ. ρετινοϊκό οξύ) και τέλος η ρύθμιση μέσω αυξητικών παραγόντων (π.χ. EGF)⁽¹⁵¹⁾.



Εικόνα 34. Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης κατά τη σπερματογένεση πραγματοποιείται σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετά-μεταφραστικό επίπεδο. Το ενδογενές πρόγραμμα επηρεάζεται από εξωγενή σήματα που προέρχονται από το ενδοκρινικό σύστημα και τα γειτονικά σωματικά κύτταρα⁽¹⁵¹⁾.

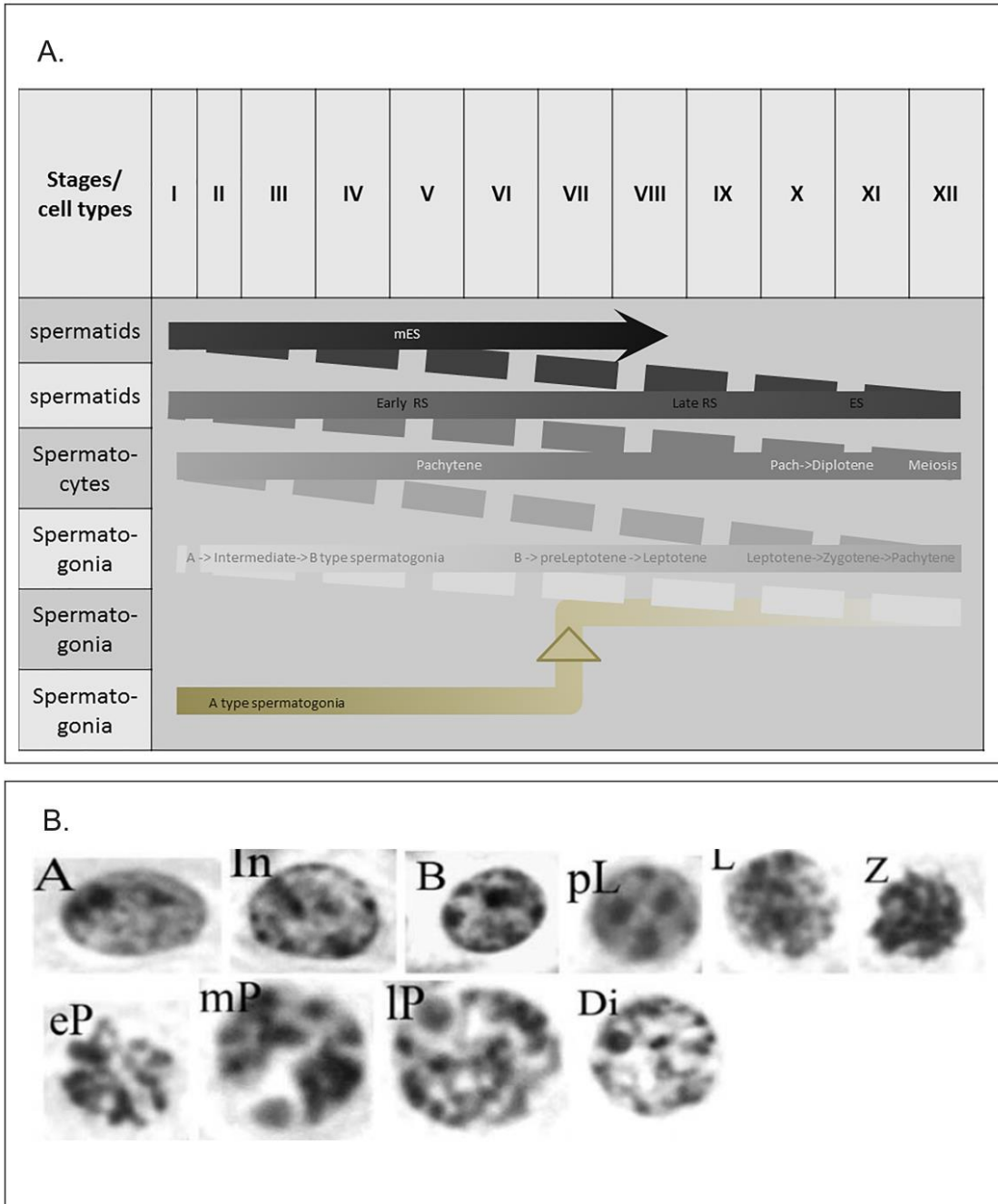
1.9.1. Ο κύκλος του σπερματοφόρου επιθηλίου στο ποντίκι

Το επιθήλιο του όρχεως στο ποντίκι περιλαμβάνει τα αρσενικά γαμετικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε ώριμο σπέρμα και τα σωματικά, τα οποία έχουν υποστηρικτικό ρόλο ως προς την παραπάνω διαδικασία. Τα αρσενικά γαμετικά κύτταρα διαχωρίζονται σε τρεις

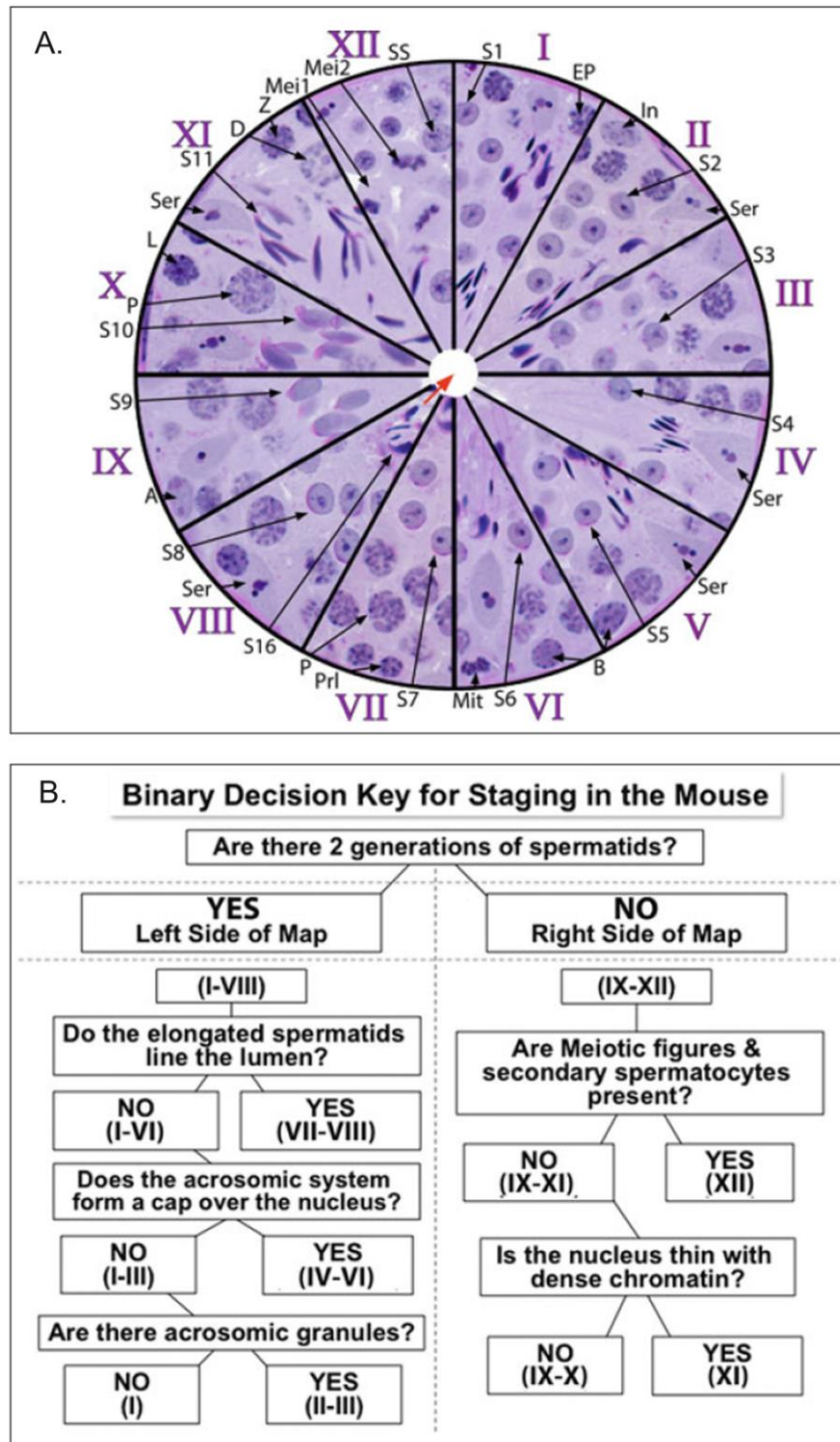
τύπου. Ο πρώτος τύπος περιλαμβάνει τα σπερματογόνια που είναι βλαστικά κύτταρα και υφίστανται δέκα διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις^(157, 158). Η τελευταία από αυτές οδηγεί στην παραγωγή του δεύτερου τύπου αρσενικών γαμετοκυττάρων που είναι τα σπερματοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται σε απλοειδείς σπερματίδες μέσω δύο μειωτικών διαιρέσεων, οι οποίες αποτελούν τον τρίτο τύπο γαμετικών κυττάρων του επιθηλίου του όρχεως. Στη συνέχεια, οι απλοειδείς σπερματίδες, μέσω της σπερμιόγνεσης, μετατρέπονται σε ώριμο σπέρμα.

Το 1956, ο Oakberg⁽¹⁵⁹⁾ πρότεινε το διαχωρισμό του σπερματοφόρου επιθηλίου σε 12 στάδια βασιζόμενος στα 12 από τα 16 στάδια της σπερμιόγνεσης. Ταυτόχρονα, καθόρισε τη διάρκεια ενός κύκλου του επιθηλίου για το ποντίκι στις 8.63 ± 0.26 ημέρες (207 ± 6.2 ώρες)⁽¹⁶⁰⁾. Νωρίτερα το 1952, οι Leblond και Clermont⁽¹⁶¹⁾ όρισαν ως «κύκλο του σπερματοφόρου επιθηλίου» ή απλά «κύκλο» τη σειρά των αλλαγών που συμβαίνουν σε μια δεδομένη περιοχή του επιθηλίου αυτού, μεταξύ δύο διαδοχικών εμφανίσεων των ίδιων κυτταρικών συσχετισμών. Οι κυτταρικοί συσχετισμοί στα 12 στάδια του κύκλου παρουσιάζονται στην εικόνα 35^A. Το 2009, οι Ahmed και de Rooij⁽¹⁶²⁾ συνόψισαν όλα τα κριτήρια καθορισμού των σταδίων του κύκλου σε ιδανικές και μη περιπτώσεις. Παράλληλα, διέκριναν τους τεχνικούς περιορισμούς που παρουσιάζουν οι τομές κρουστάτη και έδωσαν ένα αδρό πλαίσιο για την κατάταξή τους. Η μορφολογία του πυρήνα στα σπερματογόνια και τα σπερματοκύτταρα κατά Ahmed και de Rooij παρουσιάζεται στην εικόνα 35^B. Αργότερα το 2013, οι Meistrich και Hess⁽¹⁶³⁾ παρουσίασαν μια σχηματική αναπαράσταση των 12 σταδίων του κύκλου, με τους κυτταρικούς τύπους που χαρακτηρίζουν το καθένα από αυτά (εικ. 36^A). Ταυτόχρονα, ανέπτυξαν δυαδικό κλειδί αποφάσεων, βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες στον αρουραίο⁽¹⁶⁴⁾, με τη μορφή απλοποιημένων ερωτήσεων τύπου ναι ή όχι (εικ. 36^B). Το σύστημα αυτό διευκολύνει το χρήστη στον καθορισμό του σταδίου, καθώς στηρίζεται σε βασικές μορφολογικές παρατηρήσεις.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η πορεία της διαφοροποίησης είναι δυνατόν να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, ενδογενείς (π.χ. ορμονική ανισορροπία) και εξωγενείς (π.χ. στρες, χειρισμού ζώων εργαστηριακού σκοπού, θερμοκρασία περιβάλλοντος, διαθεσιμότητα τροφής/νερού κ.α.). Κατά συνέπεια, ο χρόνος μετάβασης από τον ένα κυτταρικό τύπο στον επόμενο μπορεί να επιμηκυνθεί ή να περιοριστεί ανάλογα. Επιπλέον, η μορφολογία των σπερματοφόρων σωληνάρων είναι συνεχόμενες χορδές εντός του ορχικού σάκου, κάτι το οποίο σημαίνει πως η μετάβαση από το ένα στάδιο στο δεύτερο δεν γίνεται με τη σειρά (πχ από το I στο II κτλ). Για τους παραπάνω λόγους είναι πιθανό, εντός του ίδιου σπερματοφόρου σωληναρίου, να ταυτοποιηθούν δύο ή και περισσότερα στάδια του κύκλου.



Εικόνα 35. Η εναλλαγή των βασικών κυτταρικών τύπων του επιθηλίου του όρχεως. **A.** Αναπαράσταση των συσχετισμών μεταξύ των γαμετικών κυτάρων στα διάφορα στάδια. *Συνομογραφίες:* A type spermatogonia: σπερματογόνια τύπου A, Intermediate: ενδιάμεσος τύπος σπερματογονίων, B type spermatogonia, B: σπερματογόνια τύπου B, preLeptotene: προ-λεπτοταινία, Leptotene: λεπτοταινία, Zygotene: ζυγοταινία, Pachytene (Pa): παχυταινία, Diplotene: διπλοταινία, Meiosis: μειωτική διαίρεση I και II, early RS (early round spermatids): πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες βήματος 1 έως 7, late RS (late round spermatids): όψιμες στρογγυλές σπερματίδες βήματος 8, ES (elongating spermatids): επιμηκνόμενες σπερματίδες βήματος 9 έως 12, mES (mature elongated spermatids): ώριμες επιμήκεις σπερματίδες βήματος 13 έως 16. **B.** Μορφολογία του πυρήνα σε σπερματογόνια και σπερματοκύτταρα κατά Ahmed and de Rooij, 2009⁽¹⁶²⁾. *Συνομογραφίες:* A: σπερματογόνια τύπου A, In: ενδιάμεσος τύπος σπερματογονίων, B: σπερματογόνια τύπου B, pL: προ-λεπτοταινία, L: λεπτοταινία, Z: ζυγοταινία, eP: πρώιμη παχυταινία, mP: ενδιάμεση παχυταινία, IP: όψιμη παχυταινία, Di: διπλοταινία.



Εικόνα 36. Κριτήρια καθορισμού των 12 σταδίων του κύκλου του σπερματοφόρου επιθηλίου. **A.** Τα 12 στάδια του κύκλου του σπερματοφόρου επιθηλίου κατά Meistrich and Hess, 2013⁽¹⁵⁵⁾. Οι ρωμαϊκοί αριθμοί αναπαριστούν τα στάδια και οι αραβικοί τα βήματα της σπερμιογένεσης. *Συνομογραφίες:* Ser: κύτταρο Sertoli, D, Diakinesis: διακίνηση, Mei1–2: 1^η και 2^η μειωτική διαίρεση, SS: δευτερογενή σπερματοκύτταρα, S1–8: σπερματίδες βήματος 1 έως 8, S9–11: σπερματίδες βήματος 9 έως 11, S16: σπερματίδες βήματος 16, κόκκινο βέλος: απελευθέρωση του ώριμου σπέρματος (spermiation). **B.** Δυαδικό κλειδί αποφάσεων για την αναγνώριση των σταδίων στο επιθήλιο του όρχεως κατά Meistrich and Hess, 2013⁽¹⁶³⁾.

1.9.2. Οι μειωτικές διαίρεσεις των σπερματοκυττάρων

Η μείωση είναι ένας ειδικός τύπος κυτταρικής διαίρεσης, από τον οποίο παράγονται απλοειδείς γαμέτες. Η δημιουργία των γαμετών προϋποθέτει τη συνεργασία ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου με εξειδικευμένες πρωτεΐνες. Λάθη και παραλείψεις σε οποιαδήποτε από αυτές τις συνιστώσες έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών και αποβολών κατά την κύηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι στον άνθρωπο περίπου το 10% όλων των συλλήψεων είναι ανευπλοειδείς. Ένας μεγάλος αριθμός αυτών οφείλεται σε λάθη διαχωρισμού των ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση^(165, 166).

Η τελευταία μιτωτική διαίρεση των σπερματογονίων τύπου B οδηγεί στη δημιουργία προ-λεπτοταινικών σπερματοκυττάρων. Αυτά εισέρχονται στην τελευταία S φάση της σπερματογένεσης και διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό δημιουργώντας τετραπλοειδή κύτταρα. Στα θηλαστικά, η αντιγραφή του DNA για τη μείωση λαμβάνει χώρα εκτός της μειωτικής φάσης σε ποσοστό 98%, ενώ ένα ποσοστό της τάξης του 2% διπλασιάζεται κατά την πρώιμη παχυταινία, εντός της μειωτικής φάσης^(151, 167).

Η προστασία της συνοχής κατά τη μειωτική διαίρεση διαμεσολαβείται από μια ειδική για τη μείωση ισομορφή του συμπλόκου της cohesin (πίνακας 1).

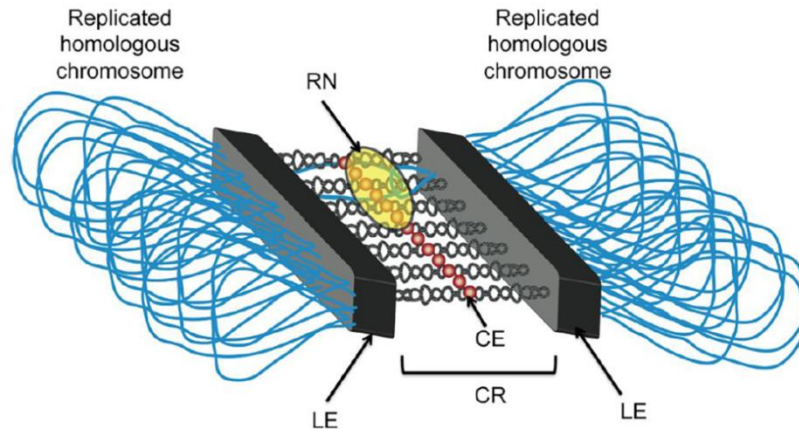
Πίνακας 1. Οι υπομονάδες του συμπλόκου της cohesin στα θηλαστικά για τη μιτωτική και τη μειωτική διαίρεση. Τροποποιημένο από Peters and Nishiyama, 2012⁽⁵⁷⁾.

Είδος υπομονάδας	Μίτωση	Μείωση
Structural Maintenance of Chromosomes	Smc1, Smc3	Smc1b, Smc3
Kleisin	Scs1	Rec8, Rad21L
Kleisin-associated	SA1/STAG1	SA3/STAG3
HEAT-repeat proteins	SA2/STAG2	
Releasin	Wapl, Pds5A, Pds5b	
Sororin	Sororin	
Adherin/kollerin	NIPBL/Scs2	
Cohesin loading	MAU-2/Scs4	
Cohesin positioning	CTCF	BORIS/CTCFL
Cohesin cleavage	Separase	
Acetyltransferase	Esco1, Esco2	
Deacetylase	HDAC8	

Βασική διαφορά με το αντίστοιχο μιτωτικό σύμπλοκο είναι ότι η μειωτική cohesin συμμετέχει στον ανασυνδυασμό μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, θα πρέπει να προστατευτεί κατά τη διάρκεια της πρώτης διαίρεσης, ώστε να είναι παρούσα και στη δεύτερη⁽¹⁶⁸⁾. Επιπρόσθετα, το σύμπλοκο της cohesin, με τη βοήθεια ορισμένων άλλων πρωτεϊνών (cohesin-like proteins, axial elements), συμμετέχει στη δημιουργία βρόχων της διπλασιασμένης χρωματίνης⁽¹⁶⁹⁾.

1.9.3. Η πρόφαση της μείωσης I

Η μειωτική πρόφαση αποτελείται από τέσσερις επιμέρους φάσεις: τη λεπτοταινία, τη ζυγοταινία, την παχυταινία και τη διπλοταινία. Αποτελεί το σημείο δημιουργίας φυσικών συνδέσεων μεταξύ των ζευγών των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Οι συνδέσεις αυτές ονομάζονται χιάσματα (chiasmata) και ορίζονται ως το σημείο στο οποίο λαμβάνει χώρα ο μειωτικός ανασυνδυασμός. Τα χιάσματα συμβάλλουν επίσης στον ορθό προσανατολισμό των ομόλογων ζευγών κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση. Δημιουργούνται μετά από θραύση της διπλής έλικας του DNA και διασταύρωση των αντίστοιχων τμημάτων των ομόλογων ζευγών⁽¹⁶⁶⁾.



Εικόνα 37. Σχηματική αναπαράσταση του synaptonemal complex. Τα διπλασιασμένα ομόλογα χρωμοσώματα συνδέονται στα πλευρικά στοιχεία (LE's) του συμπλέγματος που αποτελούνται από τις υπομονάδες Sycp 2 και Sycp 3. Τα πλευρικά στοιχεία ενώνονται μεταξύ τους διαμέσου του κεντρικού στοιχείου (CE, Sycp1), με τη βοήθεια εγκάρσιων ινιδίων (transverse filaments). Στο σημείο αυτό λαμβάνει χώρα ο γενετικός ανασυνδυασμός. CR: central region. Για λόγους απλούστευσης απεικονίζεται η μία από τις δύο αδελφές χρωματίδες κάθε ομόλογου⁽¹⁷²⁾.

Οι φυσικές συνδέσεις μεταξύ των ομόλογων ζευγών ενισχύονται και από τη δημιουργία μιας σταθερής πρωτεϊνικής δομής, ιδιαίτερα συντηρημένης από τις ζύμες έως τον άνθρωπο, που αποκαλείται synaptonemal complex^(170, 171). Το σύμπλεγμα αυτό

αποτελείται από 3 υπομονάδες (Sycp1-3) και διαχωρίζεται σε δυο πλευρικά στοιχεία (lateral elements, LE's, Sycp 2-3) και ένα κεντρικό (central element, CE, Sycp 1). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 37, τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα συνδέονται σε ένα πλευρικό στοιχείο το καθένα. Αυτά ενώνονται μεταξύ τους μέσω του κεντρικού στοιχείου (central element, CE). Στο σημείο αυτό λαμβάνει χώρα και ο ανασυνδυασμός (recombination nodules, RN's)⁽¹⁷²⁾.

Το synaptonemal complex αρχίζει να σχηματίζεται κατά την είσοδο στη φάση της λεπτοταινίας. Στο σημείο αυτό εμφανίζονται μικρής έκτασης «νήματα» κατά μήκος των αδελφών χρωματίδων των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Γύρω από αυτά, περιελίσσεται η χρωματίνη δημιουργώντας τους βρόχους. Τα «νήματα» ονομάζονται αξονικά στοιχεία (axial elements, AE's) και αποτελούνται από τις πρωτεΐνες Sycp 2 και 3. Σε κύτταρα ζύμης, όπως και στο ποντίκι αλλά και στον άνθρωπο, τα στοιχεία του συμπλόκου της cohesin (Rec8, Smc1β, Smc3) παρέχουν τη βάση για τη δημιουργία των αξονικών στοιχείων, χωρίς ωστόσο οι δυο δομές να είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους^(173, 174).

Στη φάση της ζυγοταινίας τα αξονικά στοιχεία καλύπτουν το σύνολο της επιμήκους έκτασης των χρωματίδων και από το σημείο αυτό και έπειτα αποκαλούνται πλευρικά στοιχεία. Η Sycp 3 τοποθετείται στο εξωτερικό του συμπλέγματος, προς την χρωματίνη, ενώ η Sycp 2 προς το κέντρο αλληλεπιδρώντας τόσο με την 1 όσο και με την 3⁽¹⁷⁵⁾. Η Sycp 1 δημιουργεί σύμπλοκα με πρωτεΐνες όπως οι Syce 1, Syce 2, Syce3 και η Tex12, σταθεροποιώντας τη δομή του κεντρικού στοιχείου και τη σύνδεση με τα εγκάρσια ινίδια. Ταυτόχρονα, ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών, όπως είναι οι Hormad 1, Hormad 2 και η Fkbr6, συμμετέχει στη διατήρηση και επιμήκυνση των κόμβων ανασυνδυασμού⁽¹⁷⁶⁻¹⁷⁹⁾.

Στη φάση της παχυταινίας, η σύναψη των ομόλογων χρωμοσωμάτων έχει ολοκληρωθεί και λαμβάνει χώρα ο ανασυνδυασμός τους, με την συμμετοχή πρωτεϊνών όπως η ATR και η Rad51⁽¹⁸⁰⁾. Κατά τη διπλοταινία, ο ανασυνδυασμός ολοκληρώνεται και το κεντρικό στοιχείο αποδομείται. Η κινάση Plk1 φωσφορυλιώνει τις Sycp1 και Tex 12 προκαλώντας την απομάκρυνσή τους από το κεντρικό στοιχείο, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη του. Στην συνέχεια, η Sycp3 μετατοπίζεται στα κεντρομερίδια των ομόλογων χρωμοσωμάτων, όπου και παραμένει μέχρι τη δεύτερη μειωτική διαίρεση συμμετέχοντας στη ρύθμιση του προσανατολισμού των χρωμοσωμάτων^(181- 183). Η υπομονάδα Rec8 του συμπλόκου της cohesin αφαιρείται από τους βραχίονες των ομόλογων χρωμοσωμάτων από τη separase, ενώ παράλληλα η topoisomerase IIα καταλύει την απεμπλοκή των χιασμάτων^(184, 185).

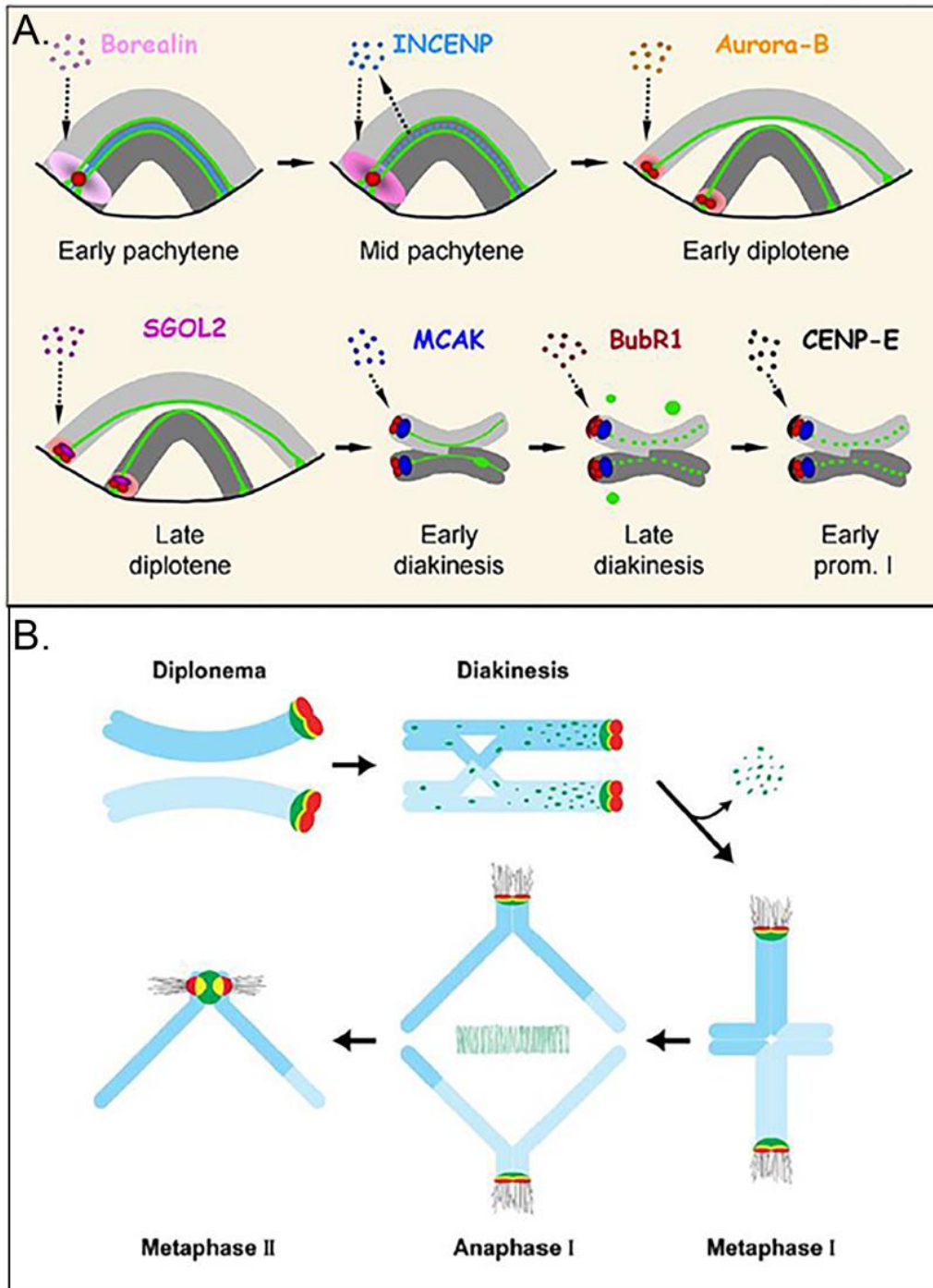
1.9.4. Το CPC συμμετέχει στη μειωτική διαίρεση I και II των σπερματοκυττάρων

Η INCENP (υπομονάδα τοποθέτησης του CPC) εντοπίζεται για πρώτη φορά στη μειωτική διαίρεση κατά τη φάση της ζυγοταινίας, στα σημεία σύνδεσης των πλευρικών στοιχείων του synaptonemal complex. Κατά την πρώιμη παχυταινία, μετακινείται στην περιοχή μεταξύ των LE's (CR, εικόνα 37), ενώ κατά την όψιμη εντοπίζεται και στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα⁽¹⁸⁶⁾. Αμέσως μετά την εγκατάστασή της στα σημεία αυτά, η Borealin λαμβάνει θέση στις ίδιες περιοχές (εικ. 38^A)⁽¹⁸⁷⁾. Η Survivin εκφράζεται κατά κύριο λόγο σε μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα⁽¹⁸⁸⁾. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Northern και in situ υβριδισμού σε σπερματοκύτταρα αρουραίου έδειξαν ότι εντοπίζεται σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων XIII έως I, στα οποία συμπεριλαμβάνεται η μειωτική φάση. Ειδικότερα, ανιχνεύθηκε σε σπερματοκύτταρα από τη φάση της παχυταινίας και μετά⁽¹⁸⁹⁾.

Στη φάση της διπλοταινίας εμφανίζονται διαδοχικά οι Aurora C και Aurora B στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα, μετά την αποσυγκρότηση του synaptonemal complex. Από το σημείο αυτό και μετά, οι υπομονάδες του CPC εντοπίζονται στις ίδιες περιοχές με την Aurora B^(186, 190).

Η ενεργοποιημένη Aurora B καταλύει τη φωσφορυλίωση της H3S10 στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα κατά τη διακίνηση (diakinesis) και σηματοδοτεί τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Στο σημείο αυτό, το CPC μετακινείται στα κεντρομερίδια όπου διευκολύνει τη συγκρότηση της μειωτικής ατράκτου. Με τον τρόπο αυτό, προσελκύονται διαδοχικά οι *sgo2* και MCAK (inner kinetochores), όπως επίσης και οι BubR1 και CENPC (outer kinetochores)^(191, 187) (εικ. 38^A).

Η παρουσία της Aurora C στα σκέλη των χρωμοσωμάτων στη διακίνηση (diakinesis), ταυτόχρονα με τα κεντρομερίδια, υποδεικνύει την ενεργό συμμετοχή της στο διαχωρισμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων (εικ. 38^B)⁽¹⁹⁰⁾. Την παραπάνω άποψη ενισχύει η παρατήρηση ότι ωκύτταρα του νηματώδους *C. elegans* που δε διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της Aurora B, δεν απελευθερώνουν την Rec8, μετά την μείωση I⁽¹⁹²⁾. Η υπομονάδα αυτή του συμπλόκου της cohesin συμμετέχει στην προστασία της κεντρομεριδιακής συνοχής κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση. Επιπλέον, ποντίκια που εκφράζουν μια ανενεργή μορφή της Aurora B έχουν μειωμένο αριθμό στρογγυλών και επιμηκυνόμενων απλοειδών σπερματίδων και επιδεικνύουν μερική παύση των μειωτικών διαιρέσεων (meiotic arrest). Επιπρόσθετα, Aurora C^{-/-} ποντικοί έχουν μη φυσιολογική μορφολογία κεφαλής, με αποκομμένο ακρόσωμα και μη συμπυκνωμένα χρωμοσώματα⁽¹⁹³⁾.



Εικόνα 38. Απεικόνιση της χρονολογικής σειράς προσέλκυσης πρωτεϊνών των κεντρομεριδίων, των κινητοχώρων και του CPC κατά τη μειωτική διαίρεση. **A.** Η διαδοχική συγκρότηση των κεντρομεριδίων και των κινητοχώρων (κόκκινο) κατά την πρόφαση I. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα LE's και με μαύρο ο πυρηνικός φάκελος⁽¹⁸⁷⁾. **B.** Η κατανομή της Aurora C (πράσινο) στη μειωτική διαίρεση. Τα κεντρομερίδια και οι κινητοχώροι σημειώνονται με κόκκινο χρώμα⁽¹⁹⁰⁾.

Η διατήρηση της Rec8 ρυθμίζεται και από τη *sgol2*. Ποντίκια που δεν διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της πρωτεΐνης αυτής παράγουν ανευπλοειδείς γαμέτες και είναι στείρα λόγω πρώιμης απελευθέρωσης της Rec8 από τα κεντρομερίδια, κατά την ανάφαση I⁽¹⁸⁵⁾.

Όμοια με τις μιτωτικές διαιρέσεις, στην μετάφαση I η Aurora B εντοπίζεται στο εσωτερικό των κεντρομεριδίων. Από την όψιμη ανάφαση I βρίσκεται στη ζώνη αποκοπής και κατά τη διακίνηση II (interkinesis) στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα. Το ίδιο συμβαίνει με την Aurora C και με την Borealin. Η διακίνηση II είναι το σημείο ανάπαυλας μεταξύ των δύο μειωτικών διαιρέσεων. Το γενετικό υλικό δε διπλασιάζεται και οι πρωτεΐνες των κινητοχώρων (MCAK, sgol2, BubR1) απουσιάζουν από τους κινητοχώρους^(186, 187). Αντίθετα με τη μείωση I και τη μίτωση, η H3S10ph απουσιάζει εξολοκλήρου από τη δεύτερη μειωτική διαίρεση⁽¹⁸⁴⁾.

Η συγκρότηση της ατράκτου για το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων (μείωση II) συμβαίνει κατά την πρόφαση II. Κατά την μετάφαση II, οι υπομονάδες smc1b και smc3, του συμπλόκου της cohesin, εμφανίζονται στα κεντρομερίδια μαζί με τις Aurora B και Aurora C. Οι τελευταίες εντοπίζονται στο εσωτερικό των κεντρομεριδίων έως την πρώιμη ανάφαση II. Από την όψιμη ανάφαση II μετακινούνται στη ζώνη αποκοπής και τελικά στο μεσόσωμα (τελόφαση II). Στις πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες (βήματα 1-7) που προκύπτουν μετά την ολοκλήρωση της μείωσης, οι ενζυμικές υπομονάδες του CPC εντοπίζονται στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα^(186, 187, 190, 194).

1.10 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, σε συνδυασμό με τα πρώιμα πειραματικά αποτελέσματα της διατριβής αυτής, υπέδειξαν ότι η λειτουργία της υπό μελέτη κινάσης είναι επικουρική στη μίτωση των σωματικών κυττάρων. Συνεπώς, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν :

1) Η μελέτη του λειτουργικού ρόλου της μιτωτικής κινάσης Haspin στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και τους γαμέτες.

2) Η ταυτοποίηση του προτύπου κατανομής της, μέσω της φωσφορυλίωσης που αυτή καταλύει (H3T3ph), με την προοπτική να εξεταστεί παράλληλα η ύπαρξη συνδυασμών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3, όπως το μοτίβο PMM (H3T3phK4me₃R8me₂).

3) Να εξεταστεί εάν οι τροποποιήσεις αυτές συμμετέχουν και πώς στην οργάνωση της χρωματίνης των απλοειδών σπερματιδίων και στον έλεγχο της γονιδιακής τους έκφρασης.

Για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής προσεγγίσεις:

α) μελετήθηκαν τομές κρυοστάτη από όρχεις νεαρού και ενήλικου ποντικού με συνεστιακή μικροσκοπία,

β) πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής για τον έλεγχο της ειδικότητας σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος και

γ) εφαρμόστηκαν τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης σε εκχυλίσματα ολικών ιστονών από ιστό όρχεως για τον εντοπισμό συνδυαστικών μοτίβων στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μορφολογικές μέθοδοι

2.1.1. Έμμεσος ανοσοφθορισμός κυττάρων

Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα E14 και οι σειρές Haspin KO και OE κυττάρων διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) σε τρυβλία επιστρωμένα με 0.1% gelatin (Gelatin from bovine skin). Το μέσο καλλιέργειας ήταν εμπλουτισμένο με 15% fetal bovine serum (FBS), 2mM penicillin/streptomycin, 2mM L-glutamine, 0.1mM non-essential aminoacids, 1mM sodium pyruvate, 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) και LIF. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% CO₂.

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός κυττάρων Haspin KO και OE πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα δημοσιευμένα πρωτόκολλα των Maison et al., 1993⁽¹⁹⁵⁾ και Meier and Georgatos, 1994⁽¹⁹⁶⁾. Πιο αναλυτικά, κύτταρα επιστρωμένα σε καλυπτρίδες καλλιεργήθηκαν μέχρι η πυκνότητά τους να φτάσει το 70-80%. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εκπλύθηκε και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 1% ή 4% φορμαλδεΐδης σε PBS (Phosphate Buffered Saline) για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρήση του εκάστοτε διαλύματος μονιμοποίησης διέφερε κατά περίπτωση, ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με PBS και επώαση με διάλυμα κορεσμού (5mM glycine σε PBS) για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την εξουδετέρωση του διαλύματος μονιμοποίησης. Μετά από έκπλυση του διαλύματος κορεσμού με PBS, τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα A (150mM NaCl, 20mM, Tris HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.5% fish skin gelatin, 0.2% Triton-X100 και 0.1mM EGTA) για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα A, για 1 ώρα, σε θάλαμο υψηλής υγρασίας και θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα A, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος και επώαστηκαν με δευτερογενές αντίσωμα, συζευγμένο με φθοριόχρωμα, για 45 λεπτά όπως παραπάνω. Κατόπιν αυτού, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα A, 1 φορά με PBS και ακολούθησε χρώση του DNA είτε με TO-PRO 3 (TO-PRO 3 iodide, Invitrogen, 6421661, τελικής συγκέντρωσης 0.2μM αραιωμένο σε PBS), είτε με ιωδιούχο προπιδίο (Propidium Iodide, Sigma Aldrich, P4170, τελικής συγκέντρωσης 2.5μg/ml). Για τη χρώση με PI προηγήθηκε επώαση με 1mg/ml RNase A σε PBS, για 40 λεπτά, σε θερμοκρασία 37°C. Στο τέλος της διαδικασίας τα κύτταρα εκπλύθηκαν 5 φορές με PBS, οι καλυπτρίδες στεγνώθηκαν και αφού προστέθηκε φορέας προστασίας από αποχρωματισμό (Vectashield mounting medium for fluorescence, Vector Laboratories, H-1000) τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και στεγανοποιήθηκαν με βερνίκι. Τα

δείγματα φυλάχθηκαν στους 4°C, στο σκοτάδι, μέχρι τη μελέτη τους σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5 TCS II. Το είδος και η αραίωση των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 4 και 5 στο τέλος του κεφαλαίου.

2.1.2. Λήψη ιστών από ποντικούς CD-1 αγρίου τύπου

Οι ποντικοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή (Αριθμός άδειας: EL33-BIOexp01/7491) στεγάζονται στο Εργαστήριο Ζώων Επιστημονικού Σκοπού (Εκτροφείο) του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με κωδικό εγκατάστασης EL33-BIObr01, EL33-BIOSup01 και EL33BIO-exp01. Τα ζώα στεγάζονται σε αεριζόμενους κλωβούς φύλαξης, εντός δωματίων του εκτροφείου, με κύκλο εναλλαγής φωτός/σκότους 12 ωρών, υγρασία 60% και θερμοκρασία φύλαξης 22°C ± 1°C. Πόσιμο νερό και τροφή παρέχονται σε απεριόριστη ποσότητα, όλο το 24ωρο.

Η λήψη των ιστών πραγματοποιήθηκε μετά από θανάτωση των ζώων μέσω εξάρθρωσης του αυχένα από τη Δρ Σουσιανά Αικατερίνη (κωδικός FELASA Modules A, B, C, D, 051/15_19_2018), σύμφωνα με το Π.Δ. 56/2013⁽¹⁹⁷⁾. Οι ιστοί ελήφθησαν άμεσα μετά την θανάτωση των ζώων και χρησιμοποιήθηκαν είτε για έμμεσους ανοσοφθορισμούς, είτε για παραγωγή εκχυλισμάτων ολικών ιστονών.

2.1.3. Παρασκευή τομών κρυοστάτη

Ιστοί που απομονώθηκαν από ποντικούς CD-1 αγρίου τύπου τοποθετήθηκαν σε μήτρα O.C.T. (Optimum Cutting Temperature compound) και πάγωσαν άμεσα με τη χρήση υγρού αζώτου. Λήφθηκαν τομές πάχους 2μm-5μm με τη χρήση κρυοστάτη, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες superfrost και στεγνώθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Οι τομές που προέκυψαν, όπως και το υπόλοιπο των ιστών φυλάχθηκαν στους -80°C.

2.1.4. Έμμεσος ανοσοφθορισμός τομών κρυοστάτη

Οι τομές κρυοστάτη αφέθηκαν να ξεπαγώσουν και να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολούθησε μονιμοποίηση σε διάλυμα 1% ή 4% φορμαλδεΐδης σε PBS για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου (ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση με διάλυμα 5mM glycine για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση με διάλυμα A (150mM NaCl, 20mM, Tris HCl pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.5% fish skin gelatin, 0.2% Triton-X100 και

0.1mM EGTA) για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα A, πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο υψηλής υγρασίας. Ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης διέφεραν ανάλογα με το αντίσωμα και ήταν από 1 έως 3,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου έως 14-16 ώρες (overnight incubation) στους 4°C. Η πορεία του έμμεσου ανοσοφθορισμού από το σημείο αυτό και έπειτα είναι όμοια με αυτή που ακολουθείται σε κύτταρα επιστρωμένα σε καλυπτρίδες και περιγράφεται στην ενότητα 2.1.1. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4 στο τέλος του κεφαλαίου.

2.1.5. Επισκόπηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο

Η μελέτη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5 TCS II. Λήφθηκαν είτε μεμονωμένες εικόνες, είτε σειρά διαδοχικών εικόνων (z-stack πάχους 0.3μm-0.4μm), οι οποίες επεξεργάστηκαν περαιτέρω με τα προγράμματα LAS X (Life Science Software Platform, Leica Microsystems), Fiji (Image J) και Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.).

2.1.6. Ταυτοποίηση σταδίων ανάπτυξης σπερματοφόρων σωληναρίων σε όρχεις και ωοθήκες ποντικού από τομές κρουστάτη

Το στάδιο του κύκλου στα σπερματοφόρα σωληνάκια αρσενικού ποντικού ταυτοποιήθηκε σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες σε τομές κρουστάτη μετά από χρώση του DNA. Τα 12 στάδια (I-XII) ενός κύκλου ανανέωσης των γαμετικών κυττάρων στο σπερματοφόρο επιθήλιο του όρχεως ταυτοποιήθηκαν κατά Oakberg E. F., 1956^(159, 160). Τα 16 βήματα (steps 1-16) της διαφοροποίησης από στρογγυλές σε ώριμες απλοειδείς σπερματίδες καθώς επίσης και τα κριτήρια ταυτοποίησης των σταδίων σε κάθε περίπτωση ταυτοποιήθηκαν κατά Ahmed and de Rooij, 2009⁽¹⁶²⁾. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε δυαδικό κλειδί αποφάσεων κατά Meistrich and Hess, 2013⁽¹⁶³⁾ με βάση την παρουσία/απουσία κυτταρικών τύπων και τους μεταξύ τους συσχετισμούς εντός του επιθηλίου. Ο ημερολογιακός διαχωρισμός της διπλοειδούς (πρόδρομα γαμετικά κύτταρα και σπερματογόνια), της τετραπλοειδούς (σπερματοκύτταρα) και της απλοειδούς (σπερματίδες) φάσης κατά το πρώτο κύμα της σπερμιογένεσης έγινε σύμφωνα με την μελέτη των Bao and Bedford, το 2016⁽¹⁷⁾.

Η διαδοχή των σταδίων ανάπτυξης των θυλακίων και της αρτησίας αναγνωρίστηκε με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά ωοθηκικών τομών κρουστάτη, μετά από χρώση του DNA.

2.2 Βιοχημικές μέθοδοι

2.2.1. Απομόνωση πυρήνων από ιστό όρχεως ποντικού

Η απομόνωση πυρήνων από ιστό όρχεως ενήλικου ποντικού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τροποποιημένο από την ερευνητική μας ομάδα πρωτόκολλο. Οι ιστοί απομονώθηκαν από τα ζώα, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, ζυγίσθηκαν και αφαιρέθηκε η κάψα τους. Όλες οι επόμενες διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στον πάγο, για την αποφυγή πρωτεόλυσης των δειγμάτων. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινο τρυβλίο petri, με τη χρήση νυστεριού και τοποθετήθηκαν σε μικρό ομογενοποιητή Dounce χωρητικότητας 3ml. Στη συνέχεια προστέθηκε παγωμένο διάλυμα H (20mM Tris HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1mM PMSF) σε αναλογία 1ml/200mg ιστού. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε μέσω μηχανικής πίεσης με 60 χτυπήματα και μεταφέρθηκε σε μεγαλύτερης διαμέτρου ομογενοποιητή Dounce (χωρητικότητας 15ml), όπου επαναλήφθηκε ο ίδιος αριθμός χτυπημάτων. Κατόπιν αυτού, προστέθηκαν στο μείγμα 0.5% Triton X-100, 20mM β-glycerol phosphate, 50mM NaF και 50mM sodium orthovanadate και πραγματοποιήθηκε επώαση υπό ανάδευση για 15 λεπτά στον πάγο. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια erpendorf και φυγοκεντρήθηκε στα 3.000rpm (Eppendorf 5417R Refrigerated Centrifuge, F-45-30-11 Rotor), για 5 λεπτά, στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο που περιείχε το κυτταροπλασματικό κλάσμα αφαιρέθηκε και το ίζημα που περιείχε τους πυρήνες χρησιμοποιήθηκε απευθείας για την απομόνωση ολικών ιστονών.

2.2.2. Απομόνωση ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ποντικού

Πυρήνες που απομονώθηκαν από ιστό όρχεως ενήλικου ποντικού υποβλήθηκαν σε εκχύλιση ολικών ιστονών με την χρήση οξέος, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.2.2.1 Απομόνωση ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ποντικού με χρήση 0.5N HCl

Οι πυρήνες επώαστηκαν με διάλυμα 0.5N HCl και 10% C₃H₈O₃, σε αναλογία 3 όγκοι διαλύματος : 1 όγκο ιζήματος (περίπου 200μl διαλύματος ανά 200mg ιστού). Το μίγμα αναμίχθηκε προσεκτικά μέχρι να διαλυθούν όλα τα στερεά στοιχεία, επώαστηκε για 30 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε στις 12.000rpm (Eppendorf 5417R Refrigerated Centrifuge, F-45-30-11 Rotor), για 5 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάριο erpendorf και χρησιμοποιήθηκε είτε για κατακρήμνιση με τη χρήση ακετόνης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, είτε για ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

Στην περίπτωση της διεξαγωγής πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης, το οξύ εξουδετερώθηκε με την προσθήκη 1M Tris base, έως ότου η τιμή του pH στο δείγμα να φτάσει το 7.5. Ακολούθησε αναπροσαρμογή της συγκέντρωσης του άλατος στα 300mM NaCl και ολονύχτια διαπίδυση σε 1L διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης A (50mM Tris HCl pH 7.4, 300mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM PMSF) στους 4°C.

2.2.3. Κατακρήμνιση ιστονών

2.2.3.1. Κατακρήμνιση ιστονών με ακετόνη

Οι ολικές ιστόνες που προέκυψαν από την παράγραφο 2.2.2.1 επωάστηκαν με 8 όγκους παγωμένης ακετόνης (περίπου 600μl ακετόνης ανά 200mg ιστού) ολονύχτια στους -20°C. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 15.000rpm (Eppendorf 5417R Refrigerated Centrifuge, F-45-30-11 Rotor), για 5 λεπτά, στους 4°C. Το ίζημα που προέκυψε αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρήθηκε σε διάλυμα PEB (30-50μl ανά 200mg ιστού), το οποίο περιείχε 300mM NaCl, 40mM Tris HCl pH 7.6, 2mM EDTA, 0.1mM DTT, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem 539134, αραιώση 1:500). Εναλλακτικά αποθηκεύτηκε χωρίς επαναιώρηση στους -20°C βραχυχρόνια ή στους -80°C μακροχρόνια.

2.2.3.2. Κατακρήμνιση ιστονών με τριχλωροξικό οξύ (TCA, C₂HCl₃O₂)

Στις ολικές ιστόνες που προέκυψαν από την παράγραφο 2.2.2.2. προστέθηκε στάγδην τριχλωροξικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 33%. Το μίγμα αναμίχθηκε και επωάστηκε για χρονικό διάστημα από 30 λεπτά έως ολονύχτια, στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε στα 16.000g, για 10 λεπτά, στους 4°C. Το ίζημα πλύθηκε 2 φορές με παγωμένη ακετόνη χωρίς να επαναιωρηθεί. Φυγοκεντρήθηκε σε συνθήκες όμοιες με παραπάνω και αφέθηκε να στεγνώσει για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναιωρήθηκε σε διάλυμα PEB (30-50μl ανά 200mg ιστού): 300mM NaCl, 40mM Tris HCl pH 7.6, 2mM EDTA, 0,1mM DTT, 1mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem 539134, αραιώση 1:500) και φυλάχθηκε στους -20°C.

2.2.4. Ανοσοκατακρήμνιση ιστονών από ιστό όρχεως ποντικού με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G

Το εκχύλισμα των ολικών ιστονών, μετά την ολονύχτια διαπίδυση σε διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης A φυγοκεντρήθηκε στις 15.000rpm (Eppendorf 5417R Refrigerated Centrifuge, F-45-30-11 Rotor), για 5 λεπτά, στους 4°C. Στο υπερκείμενο προστέθηκε

0.01% Tween 20 και 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin) και φυγοκεντρήθηκε ξανά, στις ίδιες συνθήκες. Το δείγμα που προέκυψε διαχωρίστηκε ισόποσα σε σωληνάρια erpendorf στα οποία προστέθηκαν τα κατάλληλα αντισώματα. Η επώαση για την πρόσδεση των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση για 3 ώρες, στους 4°C.

Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία, 10μl σφαιριδίων σεφαρόζης-πρωτεΐνης G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, 17-0618-01) ανά δείγμα εκπλύθηκαν 5 φορές με PBS και εξισορροπήθηκαν σε 2 όγκους διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης A, το οποίο περιείχε 150mM NaCl, 0.01% Tween 20 και 0.5% BSA. Η εξισορρόπηση των σφαιριδίων πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση για 2 ώρες, στους 4°C.

Τόσο τα δείγματα όσο και τα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G μετά το τέλος των επωάσεων κατακρημνίστηκαν. Ακολούθως έγινε συνεπώαση των δειγμάτων με τα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 4°C.

Τα σφαιρίδια κατακρημνίστηκαν μέσω φυγοκέντρησης, εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα προσαρμοσμένης αλατότητας Β (50mM Tris HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1mM PMSF, αναστολείς των πρωτεασών (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem 539134, αραιώση 1:500), 20mM β-glycerol phosphate, 50mM NaF και 50mM sodium orthovanadate) και 3 επιπλέον φορές με διάλυμα προσαρμοσμένης αλατότητας Γ (50mM Tris HCl pH 7.4, 300mM NaCl, 1mM PMSF, Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem 539134, αραιώση 1:500, 20mM β-glycerol phosphate, 50mM NaF και 50mM sodium orthovanadate). Στο τέλος προστέθηκε Laemmli για ανάλυση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου. Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοκατακρήμνιση ιστονών με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G.

Όνομα	Μάρτυρας
aP34 pre-immune serum	αρνητικός
aP3	H3T3phK4R8
aPMM	H3T3phK4me ₃ R8me ₂
aM4M8	H3T3K4me ₃ R8me ₂

2.3. Δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής

Η ειδικότητα σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος, κατά την ταυτοποίηση των προτύπων κατανομής των τροποποιήσεων της ιστόνης H3 σε όρχεις και ωθήκες ποντικού, ελέγχθηκε με δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής (competition assays). Κατά τις δοκιμασίες αυτές έγινε χρήση αντιγονικών πεπτιδίων, έναντι των οποίων έχουν παρασκευασθεί τα εκάστοτε αντισώματα, όπως επίσης και πεπτιδίου ελέγχου. Οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων τόσο στο επίπεδο των πεπτιδίων, όσο και στο επίπεδο μονιμοποίησης του ιστού.

Αναλυτικότερα, κατά την διενέργεια έμμεσου ανοσοφθορισμού τομών κρουστάτη (βλέπε παράγραφο 2.1.4.), το πρωτογενές αντίσωμα προ-επωάστηκε με τροποποιημένο ή μη πεπτιδίιο που αντιστοιχεί στα 20 πρώτα αμινοξέα της ιστόνης H3, σε συγκέντρωση 0,5μM, 1μM και 2μM. Η προ-επώαση διήρκεσε 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν το μίγμα της αντίδρασης τοποθετήθηκε στις αντικειμενοφόρους πλάκες και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός συνεχίστηκε όπως έχει περιγραφεί.

Τα πεπτιδία συντέθηκαν και καθαρίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) από το Rockefeller University Proteomics Resource Center. Οι αλληλουχίες των πεπτιδίων και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες και συγκεντρώσεις πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής.

Όνομα	Αλληλουχία	Συγκέντρωση
H3T3K4R8	ARTKQTARKSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM
H3T3phK4R8	ART _(ph) KQTARKSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM
H3T3K4me ₃ R8	ARTK _(me3) QTARKSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM
H3T3K4R8me ₂	ARTKQTAR _(asym-me2) KSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM
H3T3phK4me ₃ R8	ART _(ph) KQTAR _(asym-me2) KSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM
H3T3phK4R8me ₂	ART _(ph) K _(me3) QTARKSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM
H3T3K4me ₃ R8me ₂	ARTK _(me3) QTAR _(asym-me2) KSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM
H3T3phK4me ₃ R8me ₂	ART _(ph) K _(me3) QTAR _(asym-me2) KSTGGKAPRKQC	0,5μM, 1μM, 2μM

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Η ανάλυση των ιστονών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, υπό αναγωγικές συνθήκες (SDS-PAGE) κατά την μέθοδο του Laemmli, 1970 ⁽¹⁹⁸⁾. Πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε στα δείγματα Laemmli (20mM Tris-HCl pH 7.0, 9.2% SDS (sodium dodecyl sulfate), 40% C₃H₈O₃, 0.2% w/v bromophenol blue και 100mM DTT). Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση τους.

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου 15%, στην οποία φορτώθηκαν μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα που περιείχε 192mM glycine, 25mM Tris base και 0.1% SDS στα 180V..

2.4.1. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πηκτές μονιμοποιήθηκαν και χρώσθηκαν ταυτόχρονα σε διάλυμα 50% methanol, 12% acetic acid και 0.1% w/v Coomassie Blue. Η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνθηκε και οι ζώνες έγιναν ορατές με επώαση σε διάλυμα 10-40% methanol και 10% acetic acid.

2.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western έγινε σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα. Οι ιστόνες αναλύθηκαν αρχικά με SDS-PAGE (βλέπε παράγραφο 2.3.2.). Ακολούθησε η μεταφορά των δειγμάτων από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran 0.45μm, GE Healthcare Amersham) σε συνθήκες 45V, 500mA για 90 λεπτά. Η μεταφορά επιβεβαιώθηκε με χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Blue. Κατόπιν οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης εκπλύθηκαν με διάλυμα πλύσης που περιείχε 0.1% Tween-20 αραιωμένου σε PBS για 15 λεπτά υπό ανάδευση. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με διάλυμα Δ που περιείχε 10% BSA και 0.1% Tween-20 σε PBS για 3,5 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 4°C, υπό ανάδευση, με το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα Δ. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε από τις μεμβράνες με 2 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα πλύσης που περιείχε 0.1% fish skin gelatin (FSG) και 2 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα πλύσης χωρίς FSG. Το δευτερογενές αντίσωμα αραιώθηκε όπως και το πρώτο και προστέθηκε στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και επωάστηκε για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

υπό ανάδευση. Κατά το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας έγιναν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα πλύσης που περιείχε 0.1% FSG και 3 πλύσεις των 5 λεπτών σε διάλυμα πλύσης χωρίς FSG. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιήθηκε μέσω χημειοφωταυγείας, με την προσθήκη ECL (Western Blotting Substrate, Pierce), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.6. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή

Πίνακας 4. Πρωτογενή Αντισώματα

Αντίσωμα	Προέλευση	Αραίωση	Μονιμοποίηση	Κωδικός
aP3	Εργαστήριο Σ. Γεωργάτου ⁽⁹³⁾	1: 700	4% FA	-
aPMM	Εργαστήριο Σ. Γεωργάτου ⁽⁹⁴⁾	1: 600	4% FA	-
aM4M8	Εργαστήριο Σ. Γεωργάτου ⁽⁹⁴⁾	1:50	4% FA	-
aDazl	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:50	1% FA, 4% FA	SC-390929
aDazl	EMD Millipore	1:100	1% FA, 4% FA	ABD 31
aScml2	Δωρεά Dr S. Namekawa ⁽¹⁹⁹⁾	1:1500	4% FA	-
αγH ₂ AxS139ph	EMD Millipore	1:1500	4% FA	05-636-I
aH3K9me ₃	Novus Biologicals	1:800	4% FA	NBP1-30141
aH3S10ph	Abcam	1:2000	4% FA	ab14955
aH3K27me ₃	Upstate	1:200	1% FA	07-449
ACA	Δωρεά Α. Τζιούφα	1:300	1% FA	-
aHP1α	EMD Millipore	1:800	4% FA	MAB 3584

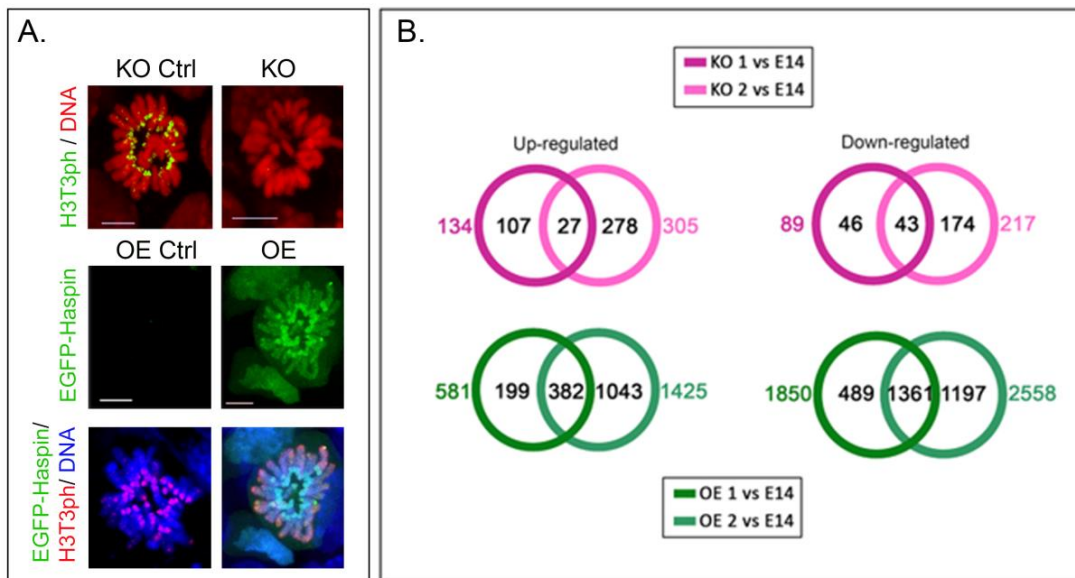
Πίνακας 5. Δευτερογενή Αντισώματα

Αντίσωμα	Προέλευση	Αραίωση	Μονιμοποίηση	Κωδικός
Goat anti-Human IgG (H+L), Alexa Fluor 568	Invitrogen	1:400	1% FA, 4% FA	A 21090
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 568	Invitrogen	1:400	1% FA, 4% FA	A 11004
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568	Invitrogen	1:400	1% FA, 4% FA	11011
Donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:400	1% FA, 4% FA	A 21202
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 647	Invitrogen	1:400	1% FA, 4% FA	A 21235
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:400	1% FA, 4% FA	A 11008
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:400	1% FA, 4% FA	11008
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Invitrogen	1:1000		65-6120

3. Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση μεταγραφώματος βλαστικών κυττάρων ποντικού, στα οποία έχει υπερεκφραστεί ή απαλειφθεί το γονίδιο της Haspin

Μέλη του εργαστηρίου κατασκεύασαν σταθερές σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού, οι οποίες είτε υπερεκφράζουν, είτε δε διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της Haspin (εικ. 39^A). Από αυτές, επιλέχθηκαν δυο κλώνοι για κάθε περίπτωση (Haspin KO, Haspin OE), από τους οποίους απομονώθηκε ολικό RNA και υποβλήθηκε σε Αλληλούχιση Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια πληθώρα γονιδίων να μεταβάλλουν την έκφρασή τους με στατιστικά σημαντικό τρόπο (εικ.39^B). Ως όριο για τις μετέπειτα αναλύσεις τέθηκε η μεταβολή αυτή να είναι τουλάχιστον 2 φορές (Fold Change, $|\log_2| \geq 2$).



Εικόνα 39. Πειράματα αλληλούχισης RNA νέας γενεάς (NGS RNA-sequencing) σε κύτταρα που υπερεκφράζουν (OE) ή δε διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της Haspin (KO). **A.** Το πρότυπο κατανομής της H3T3ph σε κύτταρα Haspin KO και OE ^(212, 218) και σε κύτταρα ελέγχου (ctrl) (Η κατασκευή των σταθερών σειρών OE και KO πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Χριστογιάννη Νατάσα και από τις Δρ. Σουσιανά Κατερίνα και Δρ. Καράνικα Ελευθερία, αντίστοιχα) . Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 5μm. **B.** Διαγράμματα Venn που απεικονίζουν τα γονίδια που επηρεάζονται σε κάθε κλώνο σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (Τα πειράματα NGS, η ανάλυση και η οπτικοποίησή τους πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Σουσιανά Κατερίνα).

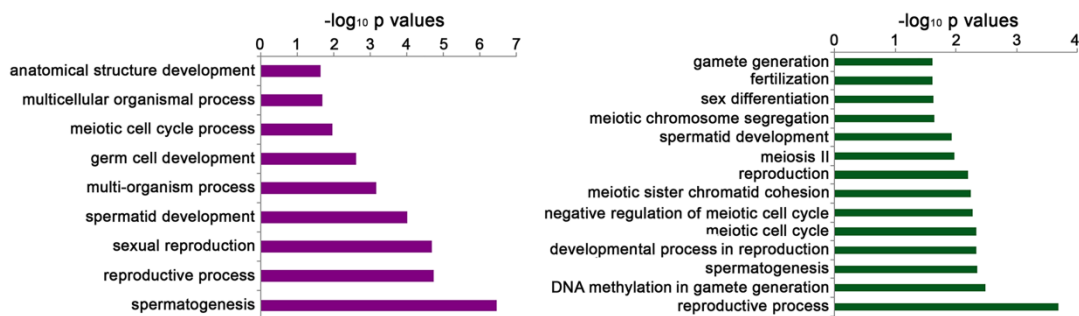
Αρχικά, δημιουργήθηκε το ερώτημα αν τα γονίδια είναι τυχαία κατανομημένα στα χρωμοσώματα και για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με τη χρήση του Fisher Exact Test. Όπως φαίνεται στην εικόνα 40, στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την Haspin αρκετά γονίδια δεν κατανέμονται με τυχαίο τρόπο. Αυτό που είναι κοινό όμως και στις δυο περιπτώσεις είναι τα φυλετικά X και Y χρωμοσώματα. Οι παρατηρήσεις αυτές

είναι αρκετά σημαντικές, καθώς στο Y χρωμόσωμα υπάρχουν γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την αζωοσπερμία (π.χ. AZFa locus) και με μια ειδική για τον όρχι μορφή καρκίνου (γοναδοβλάστωμα, GBY locus).

		Fisher exact test																					
		chr1	chr2	chr3	chr4	chr5	chr6	chr7	chr8	chr9	chr10	chr11	chr12	chr13	chr14	chr15	chr16	chr17	chr18	chr19	chrX	chrY	MT
OE p value		0.000	0.030	0.718	0.092	0.117	0.553	1.000	1.000	0.547	0.473	0.445	0.034	0.301	0.000	0.946	0.059	0.113	0.161	0.724	0.000	0.002	-
KO p value		0.787	0.125	0.555	0.799	0.596	0.597	0.527	1.000	0.592	0.378	0.355	0.742	-	-	0.736	-	0.774	0.679	0.729	0.000	0.000	-

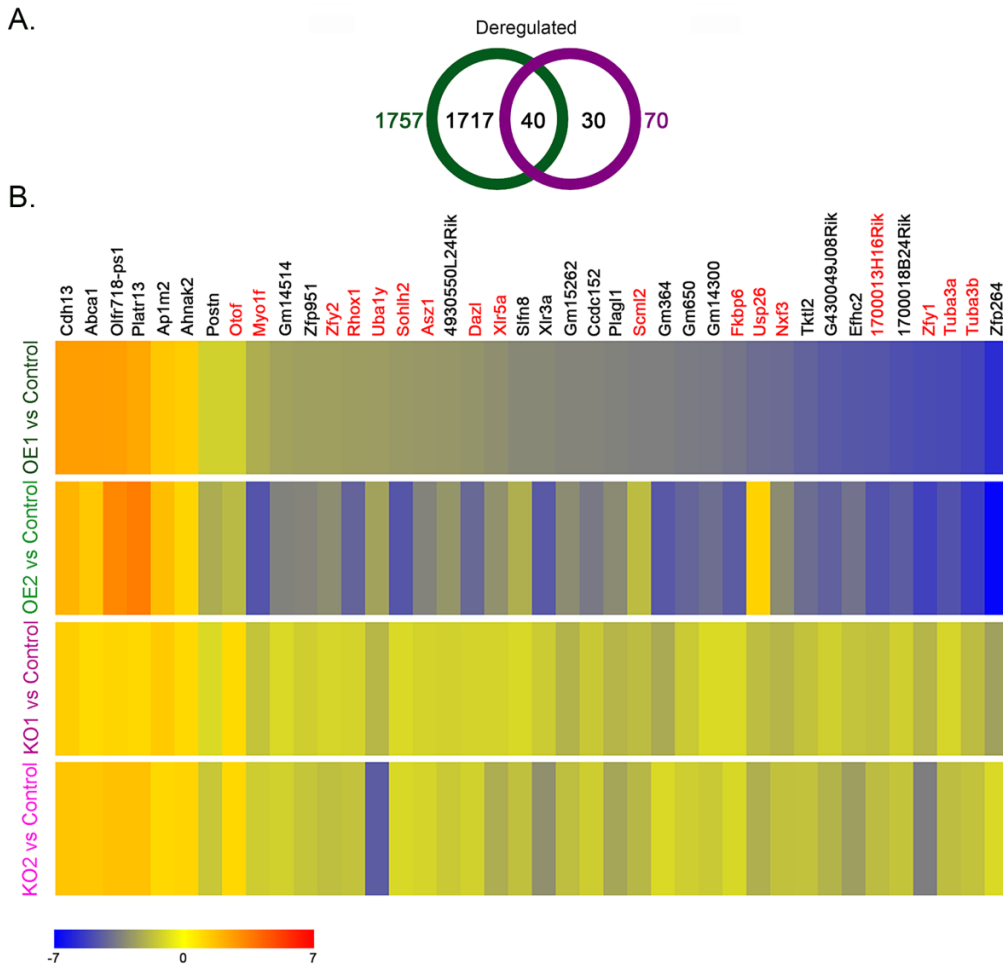
Εικόνα 40. Τα γονίδια, των οποίων η έκφραση επηρεάζεται στα Haspin KO και OE κύτταρα, κατανέμονται με μη τυχαίο τρόπο στα χρωμοσώματα. Ο συσχετισμός των κοινών γονιδίων μεταξύ των δυο κλώνων σε κάθε περίπτωση (KO1-KO2, OE1-OE2) με το συνολικό αριθμό γονιδίων ανά χρωμόσωμα διερευνήθηκε με Fisher Exact Test.

Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology Analysis) που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντικός εμπλουτισμός σε κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με τη σπερματογένεση, τη μειωτική διαίρεση και την ανάπτυξη του σπέρματος τόσο στα Haspin KO, όσο και στα Haspin OE κύτταρα (εικ.41).



Εικόνα 41. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας σε κύτταρα που υπερεκφράζουν (πράσινο) ή δεν διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο (μωβ) της Haspin έδειξε στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό σε κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με τη σπερματογένεση και τη λειτουργία του όρχεως.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ύπαρξη κοινών γονιδίων μεταξύ των KO και OE κυττάρων και βρέθηκαν 40 τέτοια γονίδια. Στο Heat Map της εικόνας 42 παρουσιάζονται τα γονίδια αυτά και ο τρόπος που μεταβάλλουν την έκφραση τους σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Σε συμφωνία με τις προηγούμενες αναλύσεις, 17 από τα 40 κοινά γονίδια σχετίζονται με τη σπερματογένεση και τη λειτουργία του όρχεως (κόκκινο χρώμα). Σε επιλεγμένα γονίδια η μεταβολή της έκφρασής τους επιβεβαιώθηκε με real time qPCR⁽²¹²⁾.



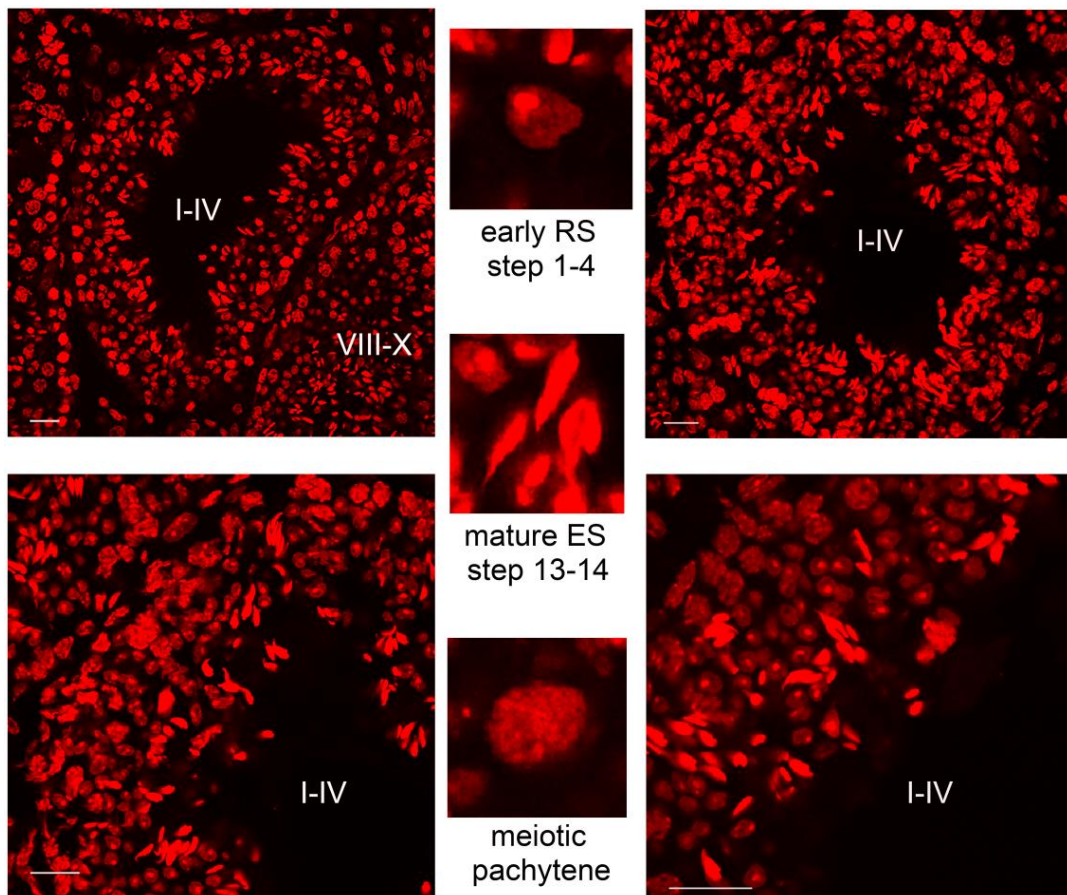
Εικόνα 42. Η υπερέκφραση και η απαλοιφή του γονιδίου της *Haspin* σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού E14 απορυθμίζει την έκφραση ειδικών για τη σπερματογένεση γονιδίων. Πειράματα αλληλούχησης RNA νέας γενεάς (NGS RNA-sequencing). **A.** Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τα κοινά μεταβαλλόμενα γονίδια ανάμεσα στους OE και KO κλώνους. **B.** Heat Map που αποτυπώνει τις μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης (log₂ scale) των κοινών γονιδίων. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται τα γονίδια που σχετίζονται με τη σπερματογένεση^(212, 218).

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα, σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που προαναφέρθηκαν, δημιούργησαν την αναγκαιότητα της διερεύνησης του λειτουργικού ρόλου της *Haspin* στη σπερματογένεση. Συνεπώς, μελετήθηκε τόσο το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης, όσο και η ενήλικη σταθερή κατάσταση. Με στόχο την απλούστευση της διαδικασίας αναγνώρισης των κυττάρων του επιθηλίου σε κάθε στάδιο, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.9, στις ενότητες που ακολουθούν παρουσιάζεται μια συνοπτική περιγραφή του κάθε σταδίου για τις τομές κρουστάτη.

3.2. Ταυτοποίηση των σταδίων του σπερματοφόρου επιθηλίου στο ποντίκι

3.2.1. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων I-IV

Στα σπερματοφόρα σωληνάρια αυτών των σταδίων το επιθήλιο καταλαμβάνει περιορισμένη έκταση, με τον αυλό να είναι εμφανώς μεγαλύτερος (π.χ. Εικ. 36^A IV).

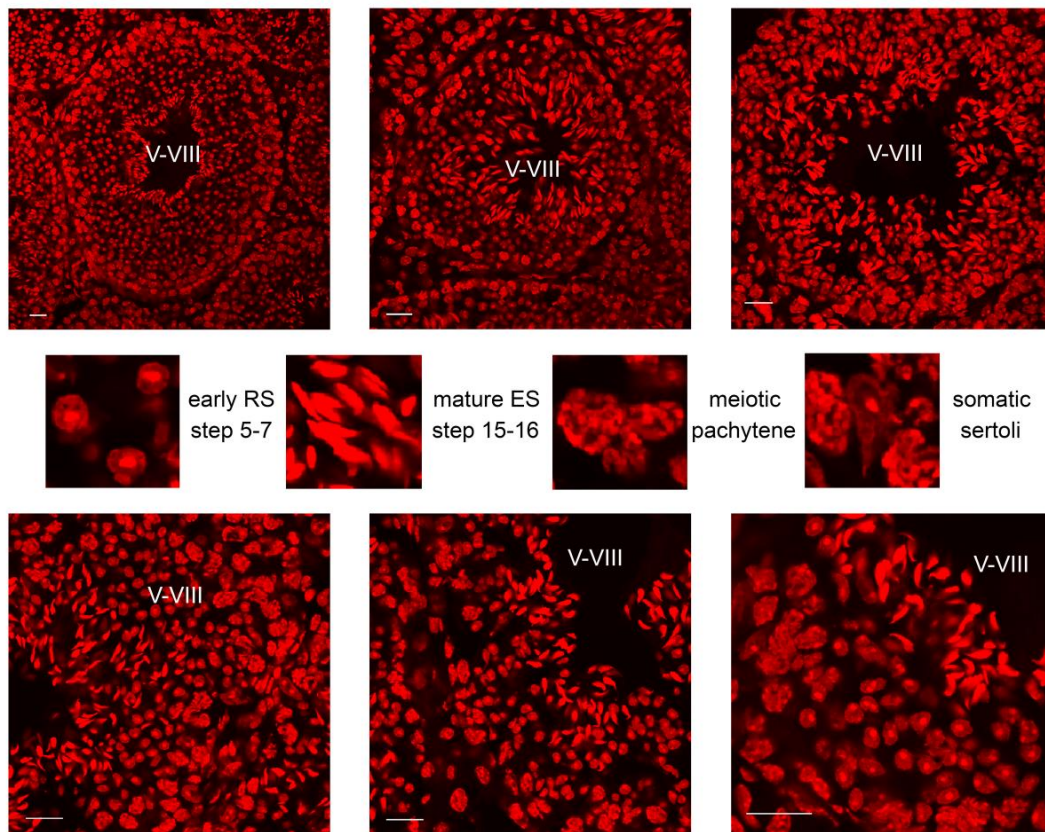


Εικόνα 43. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων I-IV στον όρχι ενήλικου ποντικού. *Μεγέθυνση:* Οι σημαντικότεροι τύποι κυττάρων που συναντώνται. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Διακρίνονται 2 γενιές απλοειδών σπερματίδων, οι πρώιμες στρογγυλές και οι ώριμες επιμήκεις σπερματίδες. Οι πρώτες διαθέτουν ένα μεγάλο ποσοστό ευχρωματίνης (εικ. 43, στο κέντρο και επάνω), ενώ οι τελευταίες (εικ. 43, στο κέντρο) δημιουργούν ομάδες υπό την μορφή πυραμίδας στο εσωτερικό του επιθηλίου, χωρίς να περιβάλλουν πλήρως τον αυλό (εικ. 43, άκρα δεξιά και αριστερά). Τα παχυταινικά σπερματοκύτταρα είναι μικρά σε μέγεθος (εικ. 38, μέση και κάτω) και βρίσκονται ακόμα κοντά στην βασική μεμβράνη. Το σωματίο XY (sex body, XY body) σε αυτά τα κύτταρα γίνεται εμφανές στα στάδια III-IV, καθώς μεταναστεύουν προς την μέση του επιθηλίου.

3.2.2. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων V-VIII (1^ο μισό)

Το επιθήλιο στα στάδια V-VIII παρουσιάζει το μέγιστο μήκος του, ενώ το μέγεθος του αυλού περιορίζεται σημαντικά. Τα σπερματογόνια τύπου B που βρίσκονται κοντά στη βασική μεμβράνη έχουν μεγάλο μέγεθος, καθώς διαιρούνται μιτωτικά και μετατρέπονται σε προ-λεπτοταινίες, ενώ τα παχυταινικά σπερματοκύτταρα συνεχίζουν να βρίσκονται στο μέσο του επιθηλίου.

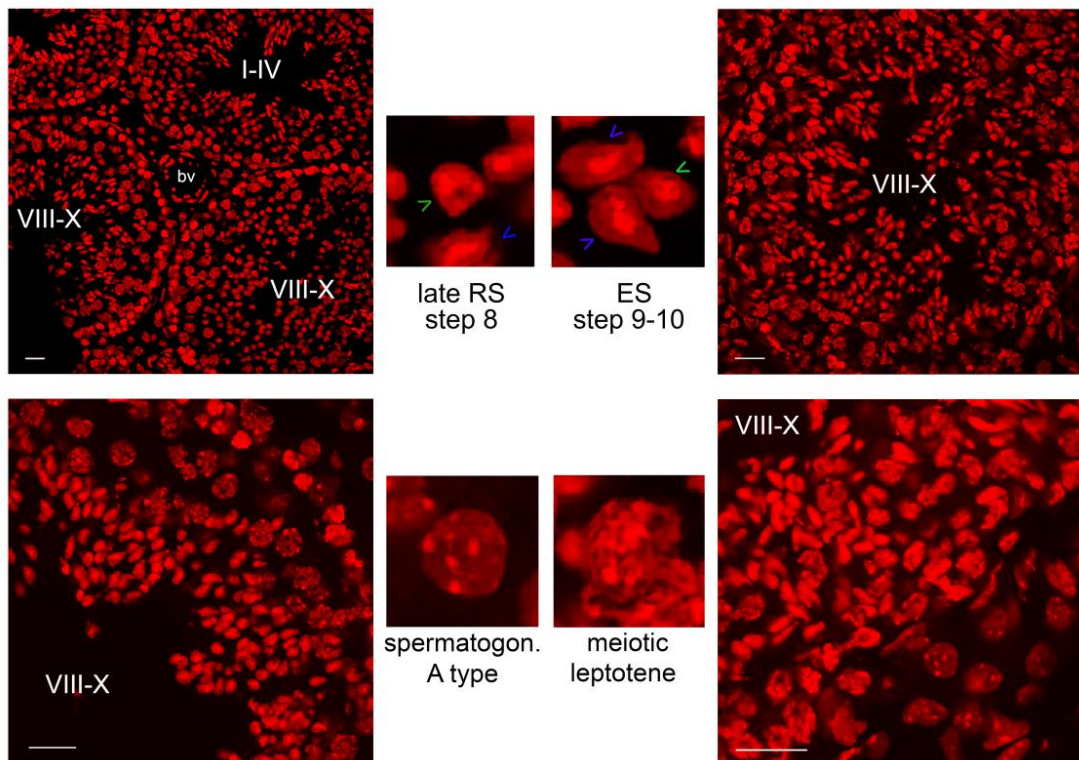


Εικόνα 44. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων V-VIII (1^ο μισό) σε τομές κρουστάτη από όρχι ενήλικου ποντικού. *Μεγέθυνση:* Οι σημαντικότεροι τύποι κυττάρων που απαντώνται. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Οι πρώιμες σπερματίδες έχουν τυπικό στρογγυλό σχήμα και οι ευχρωματινικές τους περιοχές έχουν περιοριστεί. Οι ώριμες επιμήκεις σπερματίδες σταδιακά προεκβάλλουν προς τον αυλό και τον περιβάλλουν πλήρως. Κατά το δεύτερο μισό του σταδίου VIII, η διαδικασία της σπερμιόγνεσης ολοκληρώνεται και το ώριμο σπέρμα απελευθερώνεται στον αυλό του σωληναρίου (spermiation) (εικ. 44).

3.2.3. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων VIII (2^ο μισό)-X

Τα στάδια αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας γενιάς απλοειδών σπερματιδών (όψιμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες, εικ. 45). Αντίθετα, από το δεύτερο μισό του σταδίου VIII μέχρι και το στάδιο XII παρατηρούνται δυο γενιές προφασικών σπερματοκυττάρων. Οι λεπποταινίες που αργότερα θα μετατραπούν σε ζυγοταινίες και πρώιμες παχυταινίες και οι όψιμες παχυταινίες, οι οποίες προέρχονται από τη μιτωτική διαίρεση της προηγούμενης γενιάς σπερματογονίων



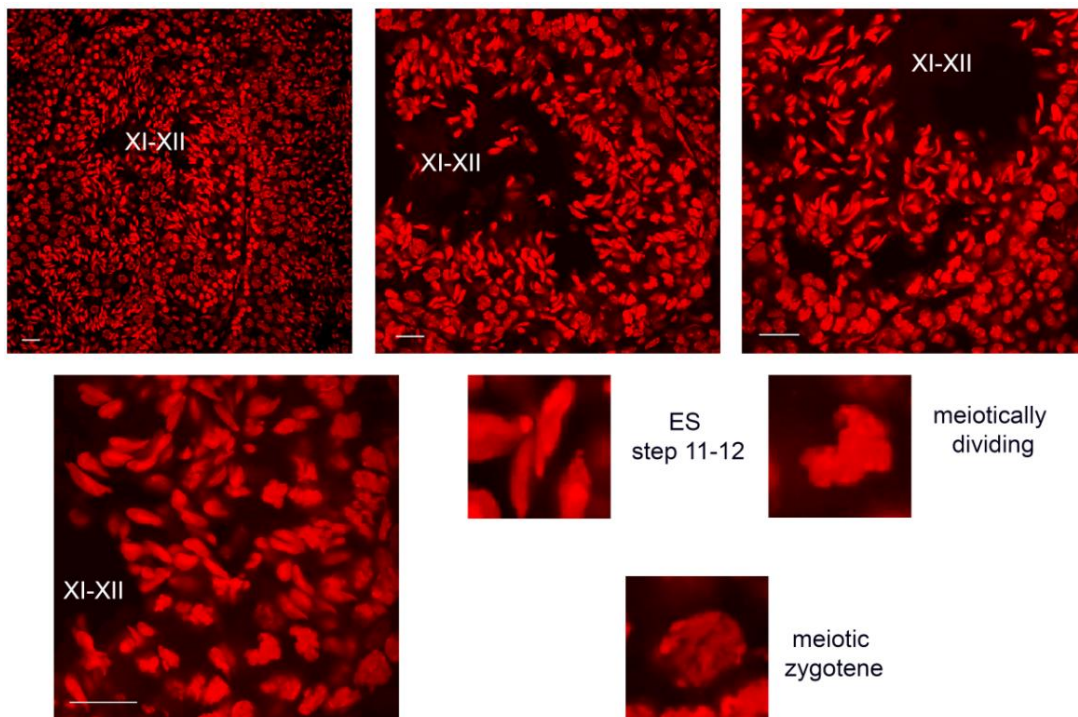
Εικόνα 45. Τομές κρουστάτη που απεικονίζουν σπερματοφόρα σωληνάρια από το 2^ο μισό του σταδίου VIII έως το στάδιο X. *Μεγέθυνση:* Οι σημαντικότεροι τύποι κυττάρων που συναντώνται. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. *Συντομώσεις:* Bv (blood vessel): αιμοφόρο αγγείο, late Round Spermatids (late RS), πράσινο βέλος: όψιμες στρογγυλές σπερματίδες βήματος 8, Elongating Spermatids (ES), μπλε βέλος: επιμηκυνόμενες σπερματίδες βήματος 9-10, spermatogonia A type: σπερματογόνια A τύπου, meiotic leptotene: μειωτικά σπερματοκύτταρα στην φάση της λεπποταινίας. Scale bars 20μm.

Το εύρος του επιθηλίου αρχικά είναι περιορισμένο (εικ. 45, κάτω σειρά), καθώς η πλειοψηφία των κυττάρων είναι οι όψιμες στρογγυλές σπερματίδες που προήλθαν από την ωρίμανση των πρώιμων σπερματιδών των σταδίων V-VIII. Αργότερα, τα κύτταρα καταλαμβάνουν ολόκληρο το εύρος του σωληναρίου, καθώς οι όψιμες στρογγυλές σπερματίδες ωριμάζουν σε επιμηκυνόμενες, με τη διαδικασία της σπερμιογένεσης.

Κατά τα στάδια IX (δεύτερο μισό) και X η επικρατέστερη μορφή κυττάρων στο επιθήλιο είναι οι επιμηκυνόμενες σπερματίδες. Το σχήμα του πυρήνα παρουσιάζεται πεπλατυσμένο, σε σύγκριση με τα προηγούμενα στάδια, ενώ η ευχρωματίνη τους είναι ακόμη αρκετά εμφανής παρά την αύξηση της έκτασης της ετεροχρωματίνης. Ταυτόχρονα τα όψιμα παχυταινικά σπερματοκύτταρα προεκβάλλουν στο κατώτατο μισό του επιθηλίου, προς τον αυλό (εικ. 45).

3.2.4. Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων XI-XII

Τα δυο τελευταία στάδια του κύκλου του σπερματοφόρου επιθηλίου χαρακτηρίζονται από την παρουσία επιμηκυνόμενων σπερματίδων βήματος 11-12, μειωτικά διαιρούμενων σπερματοκυττάρων και προφασικών κυττάρων στο στάδιο της ζυγοταινίας/παχυταινίας (εικ. 46).



Εικόνα 46. Τομές κρουστάτη που απεικονίζουν σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων XI και XII από ενήλικο ποντικό. Κάτω δεξιά παρουσιάζονται χαρακτηριστικοί τύποι κυττάρων (δεξιά). Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, οι επιμηκυνόμενες σπερματίδες αυτών των σταδίων έχουν συμπυκνωθεί σε μεγάλο βαθμό και η χρώση τους είναι χαρακτηριστικά έντονη. Μετά την αμφίπλευρη πλάτυνσή τους θα μετατραπούν στις ώριμες επιμήκεις σπερματίδες των σταδίων I-IV, με τη χαρακτηριστική πυραμιδοειδή ομαδοποίηση. Τα όψιμα προφασικά κύτταρα των προηγούμενων σταδίων (VIII-X) στο

σημείο αυτό διαιρούνται μειωτικά, δύο συνεχόμενες φορές και μετατρέπονται τελικά σε δευτερογενή σπερματοκύτταρα. Αυτά θα εισέλθουν στη σπερμιογένεση κατά τα επόμενα στάδια (I-IV), ως πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες.

3.3. Οι μιτωτικές διαιρέσεις των σπερματογονίων και οι μειωτικές διαιρέσεις των σπερματοκυττάρων

Τα σπερματογόνια είναι παρόντα σε όλη τη διάρκεια του κύκλου στα εξωτερικά στρώματα των σπερματοφόρων σωληναρίων. Διαιρούνται μιτωτικά για να ανανεώσουν τον πληθυσμό τους, ενώ κάποια από τα θυγατρικά κύτταρα ωριμάζουν προς τον επόμενο κυτταρικό τύπο, δημιουργώντας τελικά τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα που εισέρχονται στην πρόφαση της μείωσης.

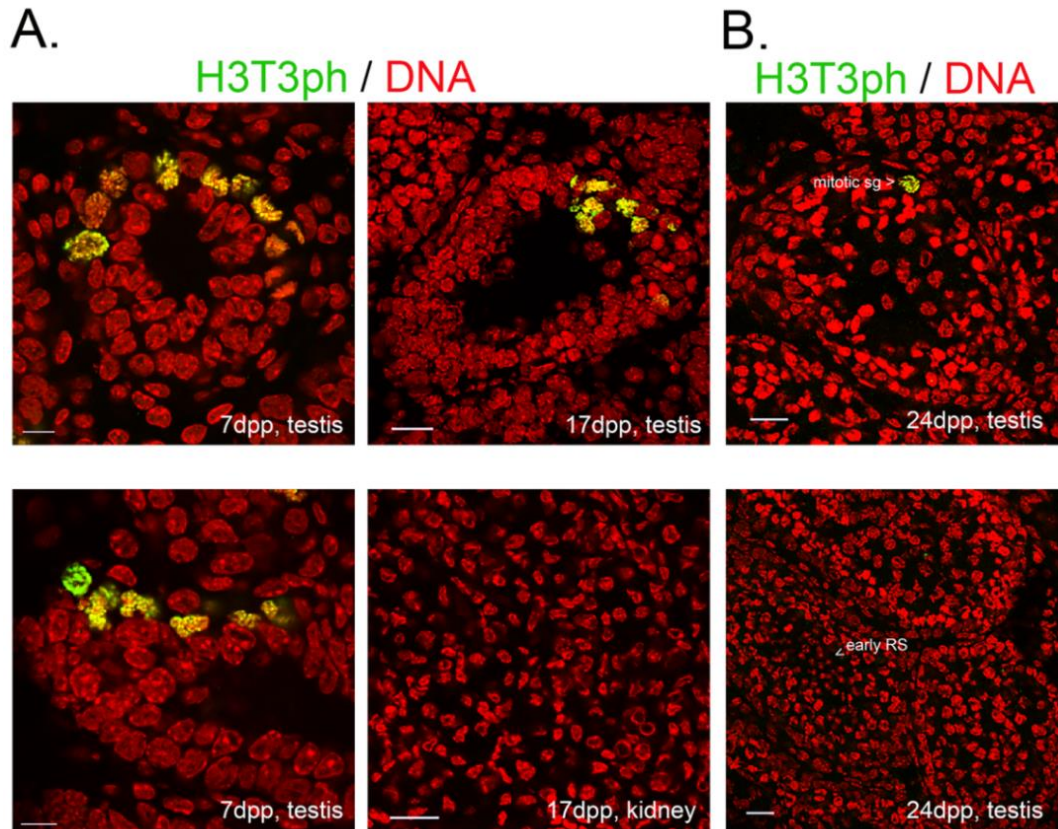
3.3.1. Η τροποποίηση H3T3rh που καταλύεται από την κινάση Haspin είναι παρούσα σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια

Αρχικά, ελέγχθηκαν τομές κρουστάτη νεαρών ποντικών, ηλικίας 7 έως 24 ημερών, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 47^A, η H3T3rh είναι παρούσα σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια νεαρών ποντικών ηλικίας 7dpp και 17dpp. Τα στάδια αυτά αντιπροσωπεύουν το τέλος της μιτωτικής φάσης των σπερματογονίων και της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, αντίστοιχα. Καμία χρώση δεν παρατηρήθηκε στον ιστό ελέγχου (εικ. 47^A, 17dpp, kidney). Παράλληλα είναι προφανές πως η μορφολογία των μιτωτικά διαιρούμενων σπερματογονίων είναι όμοια με αυτή των διαιρούμενων σωματικών κυττάρων (εικ. 47^A, 7dpp and 17dpp testis).

Την 24^η ημέρα του πρώτου κύματος της σπερματογένεσης, τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα έχουν εισέλθει στη σπερμιογένεση και έχουν εμφανιστεί οι πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες. Σε ποντικούς αυτής της ηλικίας, η H3T3rh ανιχνεύθηκε σε σπερματογόνια αναπτυσσόμενων σωληναρίων που δεν έχουν εποικιστεί πλήρως (εικ. 47^B, πάνω τμήμα), όχι όμως και σε σωληνάκια στα οποία έχουν εμφανιστεί απλοειδείς σπερματίδες (εικ. 47^B, κάτω τμήμα). Η παρατήρηση αυτή δεν αναδεικνύει την απουσία μιτωτικών διαιρέσεων, αλλά αντίθετα τονίζει την επιβράδυνση του ρυθμού τους. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί και από τους Clermont και Leblond, το 1952⁽¹⁶¹⁾ που μελέτησαν το ρυθμό ανανέωσης των σπερματογονίων στον αρουραίο.

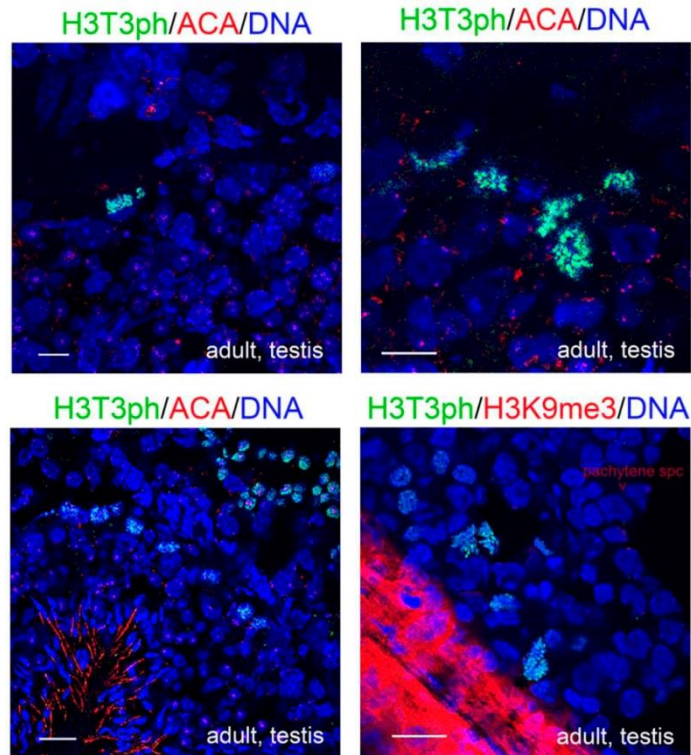
Ο Monesi, το 1962⁽²⁰⁰⁾ μελέτησε τον ρυθμό ενσωμάτωσης της θυμιδίνης (H³ – thymidine) σε όρχεις ενήλικου ποντικού. Σύμφωνα με τη μελέτη του, στους ενήλικους ποντικούς παρατηρούνται έξι διαφορετικές μιτωτικές διαιρέσεις. Από αυτές, οι τέσσερις

αφορούν σπερματογόνια τύπου A (στάδια VIII-IX, X-XI, XII-I, II του κύκλου), μία αφορά τα ενδιάμεσα σπερματογόνια (Intermediate, In) στο στάδιο III-IV και μία τα σπερματογόνια τύπου B (στάδια V-VI του κύκλου). Παράλληλα, ο de Rooij το 1973⁽¹⁵⁷⁾ παρατήρησε πως η πλειοψηφία των μιτωτικών διαιρέσεων αφορά τα A₂, A₄, In και B σπερματογόνια μαζί με το 10% των A_{paired} και A_{isolated} σπερματογονίων.



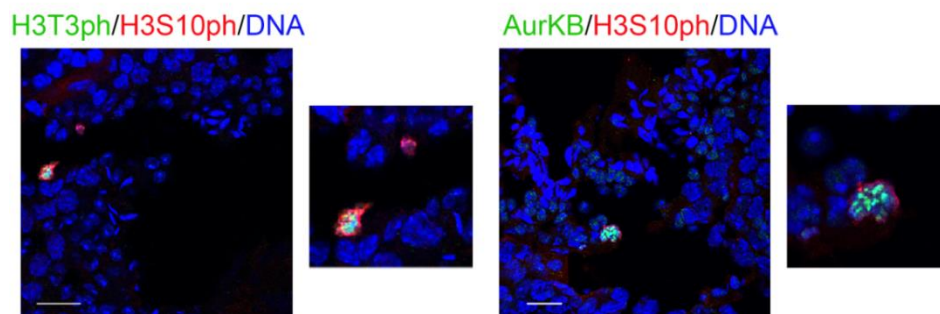
Εικόνα 47. Ο εντοπισμός της H3T3ph κατά το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης. **A.** Μιτωτικά σπερματογόνια σε όρχεις από νεαρό ποντίκι 7dpp και 17dpp εμφανίζονται θετικά με το αντίσωμα έναντι της H3T3ph. Ο ιστός ελέγχου (νεφρός) είναι αρνητικός για την ίδια τροποποίηση. **B.** Το σπερματογόνο επιθήλιο ποντικών ηλικίας 24dpp, πριν (πάνω) και μετά (κάτω) την έναρξη της σπερμιόγνεσης, διαφέρει ως προς την ανίχνευση της H3T3ph. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 10μm.

Στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκε η παρουσία μιτωτικά διαιρούμενων σπερματογονίων στην περιφέρεια σωληναρίων σταδίων XII-I και V-VIII, γεγονός που συμπίπτει με τις παραπάνω παρατηρήσεις. Τα σπερματογόνια αυτά έφεραν την H3T3ph. Μια πιο προσεκτική ανάλυση έδειξε πως η κατανομή της H3T3ph μοιάζει με αυτή των μιτωτικά διαιρούμενων σωματικών κυττάρων, καταλαμβάνοντας το σύνολο του χρωμοσωμικού βραχίονα στα πρώτα στάδια και τις περικεντρομεριδιακές περιοχές στα επόμενα (εικ. 48, πάνω σειρά). Τα κύτταρα αυτά ήταν προσανατολισμένα κοντά στη βασική μεμβράνη του σωληναρίου, εμφανώς διαχωρισμένα από τα μειωτικά σπερματοκύτταρα (εικ 48, κάτω σειρά).



Εικόνα 48. Ο εντοπισμός της H3T3ph σε σπερματογόνια ενήλικου ποντικού. Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι της H3T3ph και της Crest (ACA). Η H3T3ph βρίσκεται τόσο στις περικεντρομεριδιακές περιοχές, όσο και στα σκέλη των χρωμοσωμάτων. Η ταυτόχρονη χρώση τομών κρουστάτη με τα aH3T3ph και a H3K9me₃ υπέδειξε ότι τα διαιρούμενα σπερματογόνια που έχουν H3T3ph είναι εμφανώς διαχωρισμένα από τα προφασικά σπερματοκύτταρα (μειωτική διαίρεση). Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 10μm.

Τα μιτωτικά σπερματογόνια παρουσίασαν κατανομή της H3S10ph στην περιφέρεια των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων, όπως συμβαίνει και στα σωματικά κύτταρα (εικ. 49, αριστερά). Ακόμη, στα διαιρούμενα αυτά κύτταρα ανιχνεύθηκε και η κινάση Aurora B (εικ. 49, δεξιά). Η κατανομή της τελευταίας βρέθηκε να είναι διάχυτη τόσο στις περικεντρομεριδιακές περιοχές, όσο και στα σκέλη των χρωμοσωμάτων.

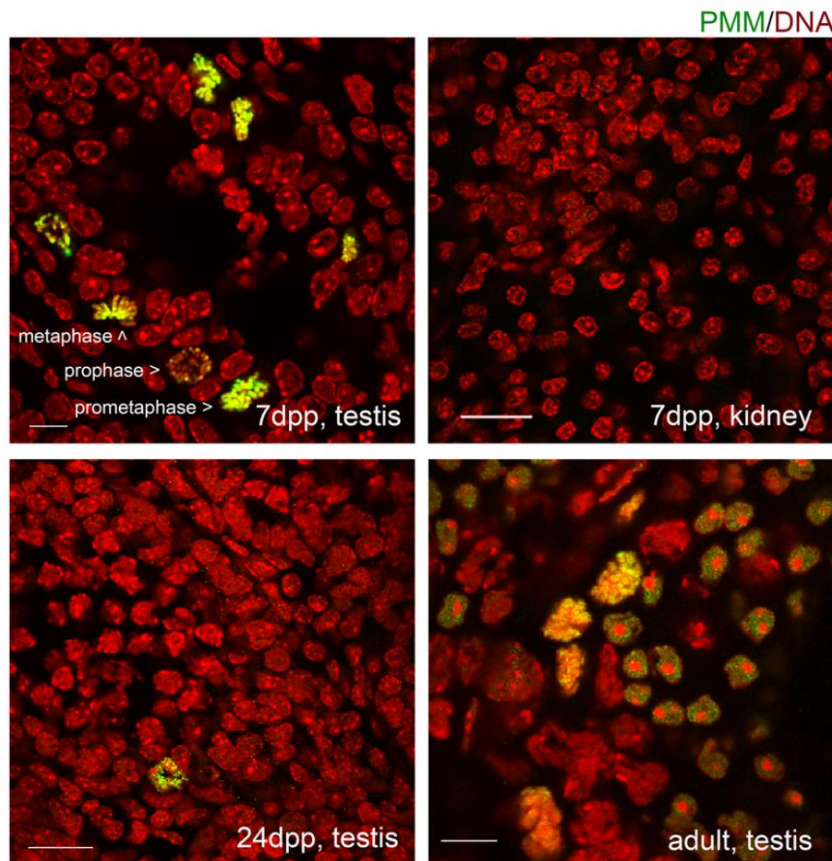


Εικόνα 49. Ενδεικτική κατανομή της H3S10ph (αριστερά) και της κινάσης Aurora B (δεξιά) σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε τομές όρχεων ενήλικου ποντικού. Οι μιτωτικές διαιρέσεις των γαμετικών κυττάρων του όρχεως έχουν ορισμένες διαφορές, από αυτές των σωματικών κυττάρων. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

3.3.2. Η τριπλή τροποποίηση PMM ($H3T3rhK4me_3R8me_2$) εντοπίζεται σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια

Εφόσον η $H3T3rh$ αποτελεί τμήμα του μοτίβου PMM, θεωρήθηκε αναγκαίο να εξεταστεί και η παρουσία του τελευταίου σε κύτταρα του επιθηλίου του όρχεως. Το aPMM αντίσωμα παρασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου⁽⁹⁴⁾.

Όμοια με τα παραπάνω, η παρουσία της PMM–υπογραφής ελέγχθηκε σε τομές κρουστάτη, από όρχεις νεαρού (7dpp, 17dpp, 24dpp) και ενήλικου ποντικού. Στους νεαρούς ποντικούς, ηλικίας 7dpp, ταυτοποιήθηκε η παρουσία της PMM–υπογραφής σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια. Τα διαιρούμενα κύτταρα εντοπίστηκαν κοντά στη βασική μεμβράνη των σωληναρίων (εικ. 50, αριστερά), ενώ ο αντίστοιχος ιστός ελέγχου ήταν αρνητικός (εικ. 50, πάνω δεξιά).



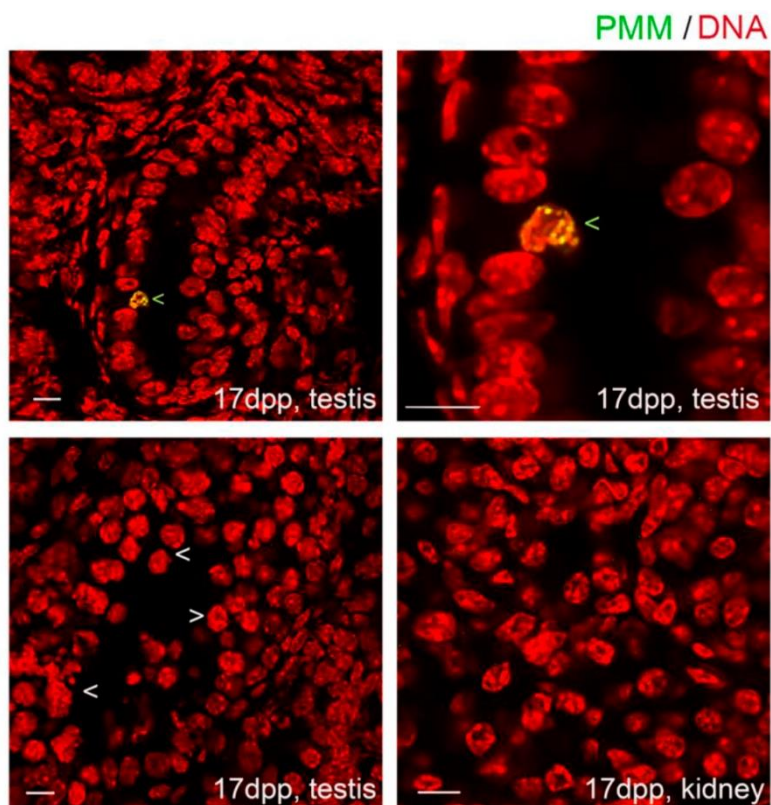
Εικόνα 50. Η τροποποίηση PMM ανιχνεύεται σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια. Τομές κρουστάτη από όρχεις νεαρού ποντικού 7dpp και 24dpp, ενήλικου ποντικού, καθώς και ιστού ελέγχου (νεφρός). Με λευκό βέλος σημειώνονται κύτταρα στη φάση της πρόφασης, προμετάφασης και μετάφασης της μίτωσης. Scale bars 10μm.

Το πρότυπο κατανομής κατά την πρόφαση και την προμετάφαση ήταν όμοιο με αυτό που έχει περιγραφεί από τους Markaki et al., το 2009⁽⁹⁴⁾. Καταλάμβανε τις κεντρομεριδιακές περιοχές στην πρόφαση, ενώ εκτεινόταν και στους βραχίονες των χρωμοσωμάτων κατά την προμετάφαση. Αντίθετα με ό,τι περιγράφηκε παραπάνω και

αφορά και τα σωματικά κύτταρα, κατά την μετάφαση της μίτωσης στα σπερματογόνια η PMM-υπογραφή καταλαμβάνει τόσο τις κεντρομεριδιακές περιοχές, όσο και τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων (εικ. 50, πάνω αριστερά).

Στους ενήλικους ποντικούς η PMM-υπογραφή, όπως και η H3T3rh, ανιχνεύτηκε σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων XII-I και V-VIII. Το πρότυπο κατανομής της είναι ίδιο με αυτό που περιγράφεται παραπάνω για τους νεαρούς ποντικούς (εικ. 50 κάτω δεξιά, adult testis, σε σύγκριση με 7dpp και 24dpp).

Τα σπερματοφόρα σωληνάρια από όρχεις νεαρού ποντικού 17dpp, τα οποία βρίσκονται στην πρόφαση της μείωσης (στάδιο προ-λεπτοταινίας/λεπτοταινίας κατά το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης), ήταν αρνητικά για τη συγκεκριμένη τροποποίηση, το ίδιο και ο ιστός ελέγχου (νεφρός) (εικ. 51 κάτω αριστερά, 17dpp testis και κάτω δεξιά, 17dpp kidney). Η μόνη ένδειξη παρουσίας της PMM υπογραφής σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο προερχόταν από μη ανεπτυγμένα σπερματοφόρα σωληνάρια, τα οποία δεν είχαν ολοκληρώσει τη μιτωτική φάση ανάπτυξης (εικ. 51 17dpp testis κάτω αριστερά, στη μειωτική φάση, έναντι πάνω, στη μιτωτική φάση ανάπτυξης του επιθηλίου).



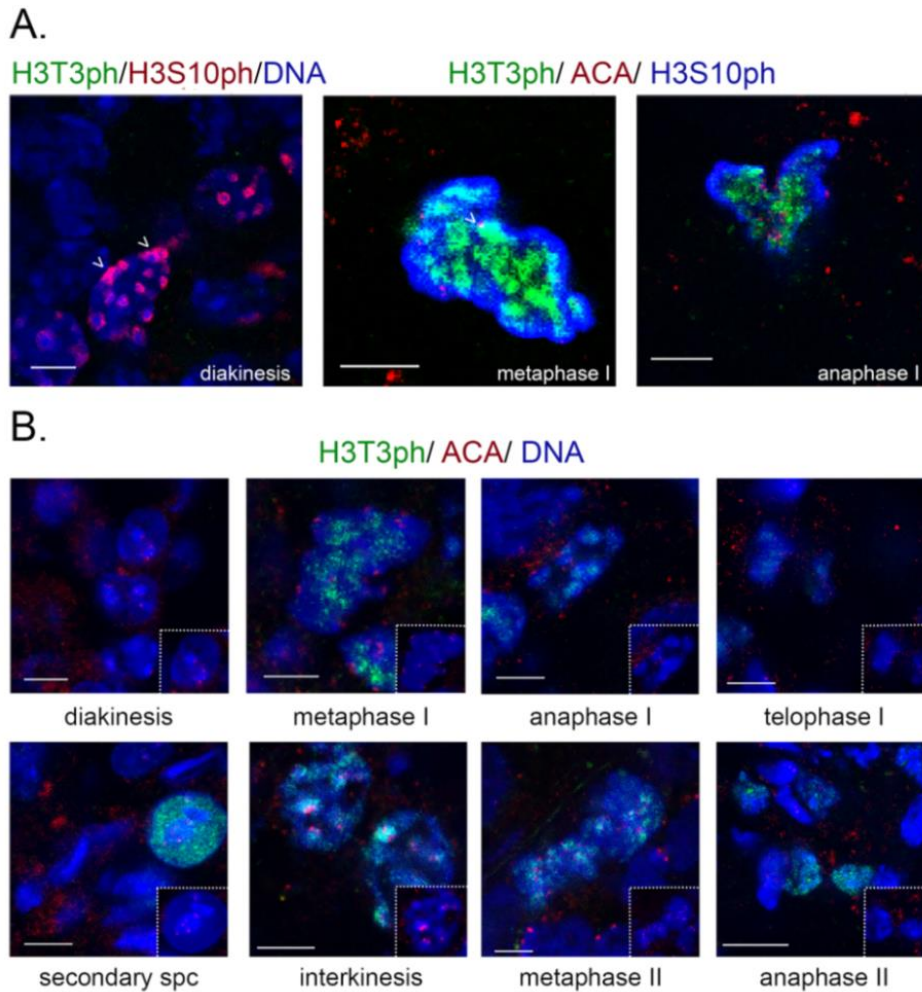
Εικόνα 51. Σε ποντικούς ηλικίας 17 ημερών η τροποποίηση PMM ανιχνεύεται σε μη ανεπτυγμένα σπερματοφόρα σωληνάρια, τα οποία δεν έχουν ολοκληρώσει τη μιτωτική φάση ανάπτυξης (πάνω αριστερά). Αντίθετα, όσα σωληνάρια έχουν εισέλθει στη μειωτική φάση (κάτω αριστερά) δε φέρουν την υπογραφή PMM. Με πράσινο βέλος σημειώνεται μιτωτικά διαιρούμενο σπερματογόνιο (πάνω σειρά, προμετάφαση). Με άσπρο βέλος (κάτω αριστερά) σημειώνονται μειωτικά σπερματοκύτταρα στη φάση της προ-λεπτοταινίας/λεπτοταινίας. Σε τομές κρουστάτη από νεφρό ποντικού 17dpp δεν ανιχνεύτηκε η υπογραφή PMM. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 10μm.

3.3.3. Οι τροποποιήσεις H3T3ph και PMM συμμετέχουν στις δύο μειωτικές διαιρέσεις

Κατά την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, τα ομόλογα χρωμοσώματα δημιουργούν συνάψεις μεταξύ τους. Αυτές σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζυγοταινίας και ολοκληρώνονται κατά τη διάρκεια της παχυταινίας. Μέσω του synaptonemal complex λαμβάνει χώρα ο ομόλογος ανασυνδυασμός των χρωμοσωμάτων. Στη μετάφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης διαχωρίζονται τα ομόλογα χρωμοσώματα, ενώ στη δεύτερη μειωτική διαίρεση διαχωρίζονται οι αδελφές χρωματίδες. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα μετατρέπονται από τετραπλοειδή σε διπλοειδή και τελικά απλοειδή⁽¹⁶⁸⁾.

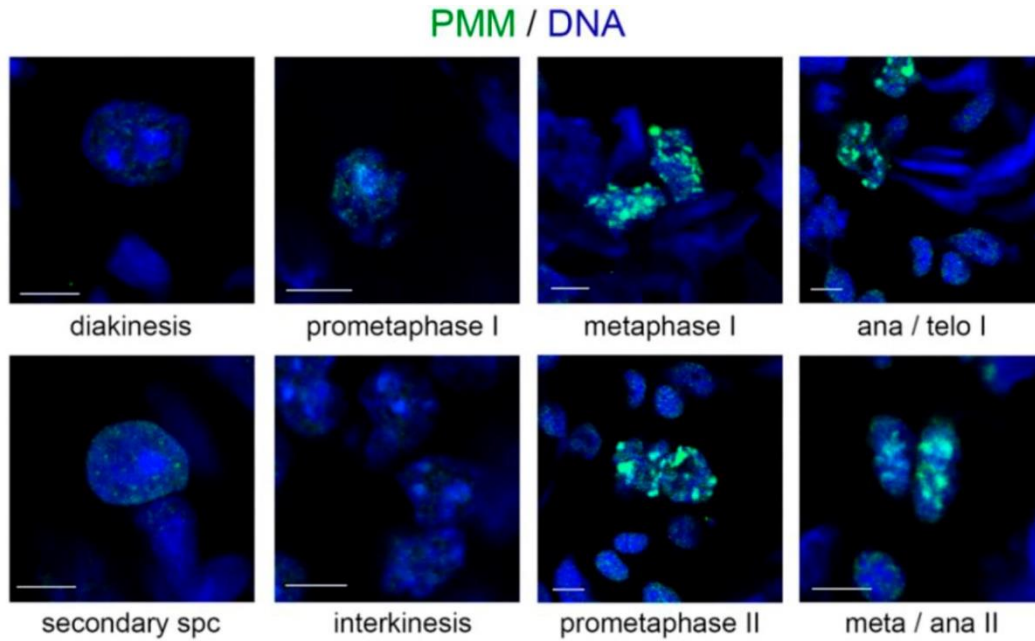
Σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίου XI-XII μελετήθηκαν με σκοπό να ελεγχθεί η παρουσία ή μη της Haspin, μέσω της φωσφορυλίωσης που αυτή καταλύει αφού δεν υπάρχει λειτουργικό αντίσωμα έναντι της κινάσης. Η H3S10ph παρουσίασε το τυπικό πρότυπο που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία καθ' όλη την διάρκεια της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και απουσίαζε εντελώς από τη δεύτερη^(184, 186, 201). Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας σπερματοκυττάρων που διανύουν την πρώτη μειωτική διαίρεση (εικ. 52^A).

Αντίθετα με την H3S10ph, η H3T3ph απουσίαζε εντελώς από τα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα κατά τη διακίνηση. Κατά την μετάφαση I, παρουσίασε διάχυτη κατανομή που εκτεινόταν σε όλο το μήκος των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Η κατανομή αυτή ήταν εντονότερη στις περικεντρομεριδιακές περιοχές κατά την ανάφαση I, ενώ περιορίστηκε κατά την τελόφαση I. Μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης (interkinesis), η H3T3ph ανιχνεύθηκε μόνο στην περικεντρομεριδιακή περιοχή, μια κατανομή που διατήρησε έως τη μετάφαση II. Τέλος κατά την ανάφαση II, η H3T3ph ήταν ακόμα ανιχνεύσιμη (εικ. 52^B).



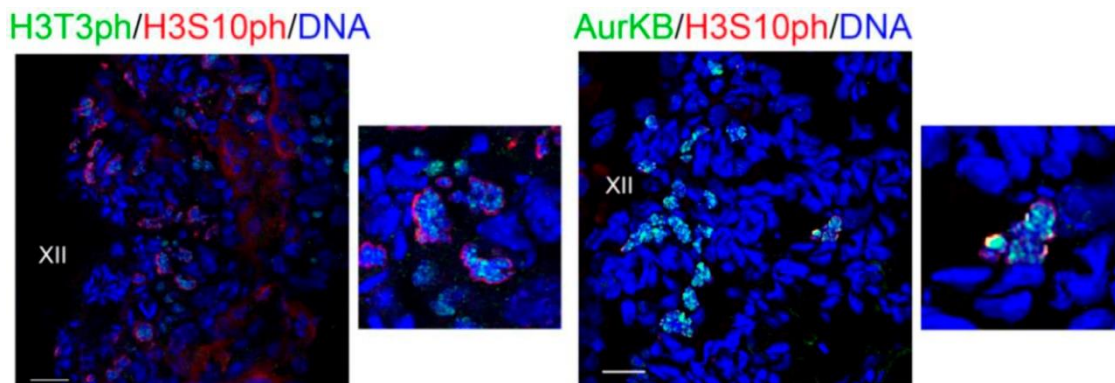
Εικόνα 52. Το πρότυπο κατανομής της H3T3ph σε μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα. **A.** Διαιρούμενα κύτταρα σπερματοφόρων σωληναρίων σταδίου XII που παρουσιάζουν τη σχετική θέση των H3T3ph, H3S10ph και Crest (ACA). Από αριστερά προς τα δεξιά διακρίνονται κύτταρα στα στάδια: διακίνηση, μετάφαση I και ανάφαση I. **B.** Αναλυτική παρουσίαση της θέσης της H3T3ph κατά την πρώτη και τη δεύτερη μειωτική διαίρεση. Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι της H3T3ph και της Crest. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 5μm.

Η τροποποίηση PMM ανιχνεύτηκε επίσης κατά την διακίνηση στα σπερματοφόρα σωληνάκια σταδίου XII. Το μοτίβο PMM εντοπίστηκε στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων, με έμφαση στις περικεντρομεριδιακές περιοχές κατά την πρώτη διαίρεση. Αντίθετα περιορίστηκε σταδιακά στις περικεντρομεριδιακές περιοχές κατά την δεύτερη μειωτική διαίρεση (εικ. 53). Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα παραπάνω ευρήματα, ότι δηλαδή η τροποποίηση PMM (όπως και η H3T3ph) παρουσιάζεται στα μειωτικά κύτταρα μετά την αποδόμηση των συνάψεων του synaptonemal complex και τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, προτού όμως ολοκληρωθεί η πρώτη μειωτική διαίρεση.



Εικόνα 53. Πρότυπο κατανομής της τριπλής τροποποίησης PMM σε μειωτικά σπερματοκύτταρα. **A.** Το μοτίβο PMM εντοπίζεται σε σπερματοκύτταρα κατά την πρώτη αλλά και τη δεύτερη μειωτική διαίρεση. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές όρχεως ενήλικου ποντικού (κρυστομές) με το anti-PMM αντίσωμα. **B.** Δοκιμασία ανταγωνιστικής αναστολής με συνθετικά πεπτιδία και το anti-PMM αντίσωμα σε σωληνάρια σταδίου XII (μειωτική διαίρεση, βλ. εικ. 35-36). Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 5µm (**A**) και 20µm (**B**).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, η κινάση Aurora B ανιχνεύθηκε σε μειωτικά σπερματοκύτταρα, κατά τη φάση της διαίρεσης. Τα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού στα σωληνάρια σταδίου XII έδειξαν ότι ένζυμα (π.χ. Aurora B) και τροποποιήσεις (π.χ. H3T3ph, H3S10ph), οι οποίες διαμεσολαβούν τις μιτωτικές διαιρέσεις, είναι παρόντα και κατά τη διάρκεια των μειωτικών διαιρέσεων (εικ. 54).

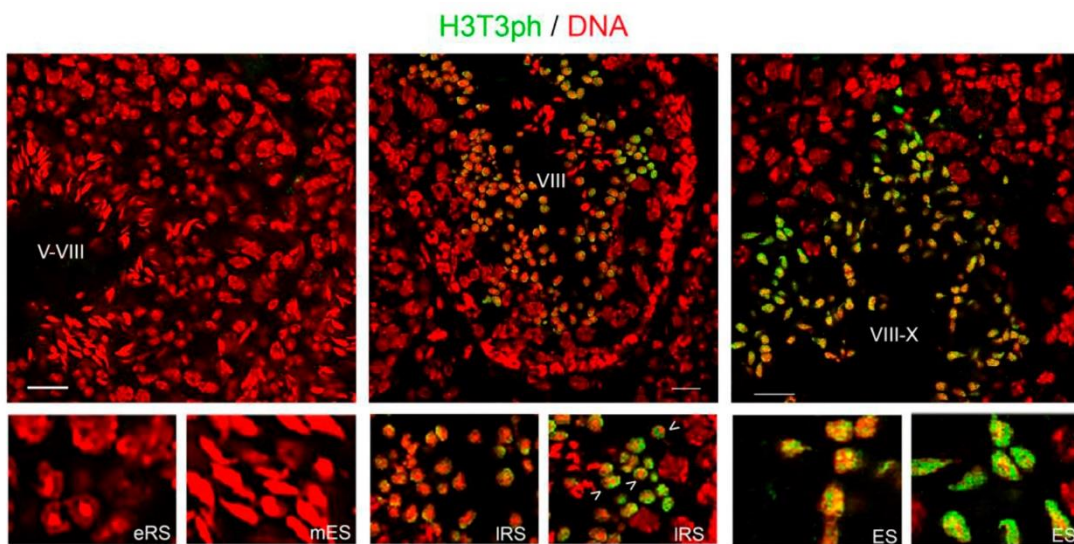


Εικόνα 54. Ενδεικτική κατανομή της H3S10ph (αριστερά) και της κινάσης Aurora B (δεξιά) σε μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε σωληνάρια σταδίου XII με τα αντίστοιχα αντισώματα και χρώση του DNA με TO-PRO 3. Scale bars 20µm.

3.4. Οι μετα-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες

3.4.1. Η H3T3ph ανιχνεύεται σε στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες, αλλά όχι σε ώριμες

Πρόσφατα δεδομένα από πειράματα αλληλούχισης RNA υπέδειξαν ότι το γονίδιο GSG2 είναι ενεργό στις απλοειδείς σπερματίδες⁽²⁰²⁾. Παράλληλα η H3T3ph ανιχνεύτηκε σε ανθρώπινα σπερματοζώα⁽²⁰³⁾. Συνεπώς ελέγχθηκε η παρουσία της H3T3ph στην μετα-μειωτική περίοδο της σπερμιόγερσης. Η υπό μελέτη τροποποίηση ανιχνεύτηκε, μέσω ανοσοφθορισμού σε σπερματοφόρα σωληνάρια που ανήκουν στα στάδια VIII-IX (εικ. 55 μέση και δεξιά).



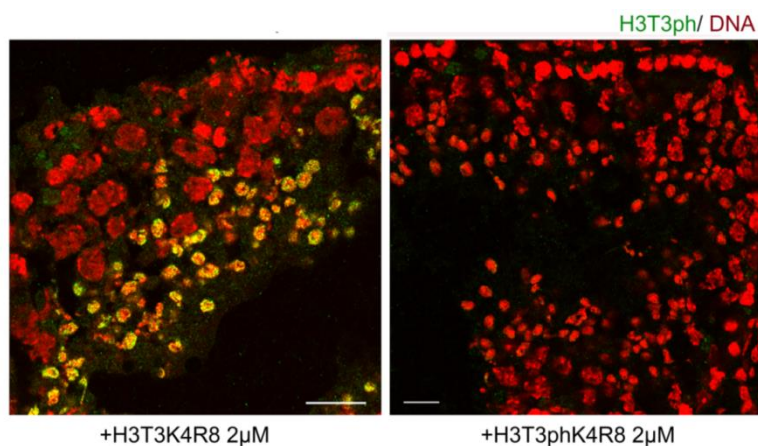
Εικόνα 55. Η H3T3ph είναι παρούσα κατά τη σπερμιόγερση του ποντικού. Τα σωληνάρια σταδίου V-VIII (αριστερά) ήταν αρνητικά για την υπό μελέτη τροποποίηση. Αντίθετα, η H3T3ph ανιχνεύτηκε σε δείγματα που αφορούσαν τα στάδια VIII-X (δεξιά) και ήταν αναγνωρίσιμη μετά την απελευθέρωση του ώριμου σπέρματος στον αυλό (μέση). Έμμεσος ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα έναντι της H3T3ph (αΡ3) και χρώση του DNA με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Ειδικότερα, η H3T3ph ανιχνεύθηκε σε στρογγυλές και επιμηκυνόμενες απλοειδείς σπερματίδες βήματος 8 (εικ. 55, μέση και λεπτομέρειες) έως 10 (εικ. 55, δεξιά και λεπτομέρειες). Βρέθηκε να καταλαμβάνει τη «χαλαρή» χρωματίνη των κυττάρων αυτών και να εξαιρείται από τα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα (εικ. 55, άσπρα βέλη). Χρονικά, η παρουσία της H3T3ph συμπίπτει με την έναρξη της ακροσωμικής φάσης της σπερμιόγερσης (βήμα 8, όψιμες στρογγυλές σπερματίδες), την αλλαγή του σχήματος του πυρήνα (βήμα 9, επιμηκυνόμενες σπερματίδες) και την έναρξη της επιμήκυνσής του (βήμα 10, επιμηκυνόμενες σπερματίδες)⁽¹⁵⁹⁾.

3.4.2. Η δοκιμασία ανταγωνιστικής αναστολής επιβεβαιώνει την ειδικότητα του αντισώματος

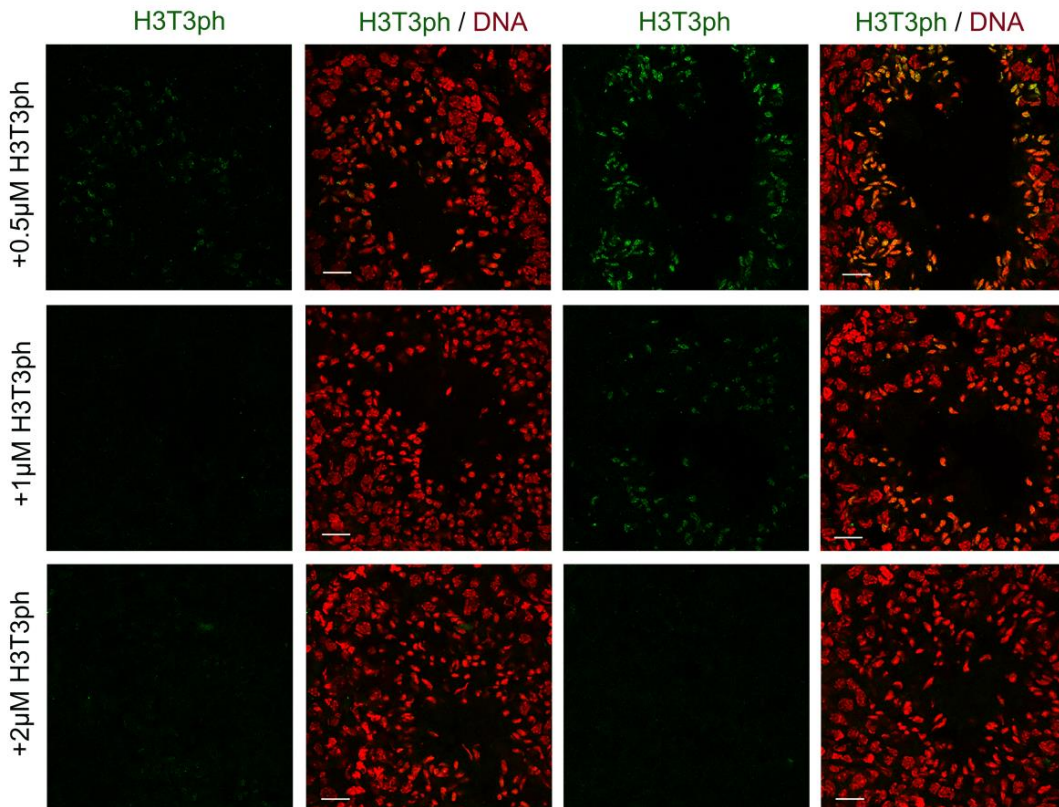
Η ειδικότητα της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος ελέγχθηκε με δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής (competition assays). Σε αυτές έγινε χρήση του ανοσογόνου πεπτιδίου, έναντι του οποίου έχει παρασκευασθεί το συγκεκριμένο αντίσωμα (H3T3rhK4R8), όπως επίσης και μη τροποποιημένου πεπτιδίου ελέγχου (H3T3K4R8). Όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων τόσο σε επίπεδο πεπτιδίων, όσο και σε επίπεδο μονιμοποίησης του ιστού.

Στην εικόνα 56, φαίνεται ότι η προσθήκη του πεπτιδίου ελέγχου στο μίγμα της αντίδρασης δεν επηρεάζει καθόλου τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Αντίθετα, η προσθήκη του ανοσογόνου πεπτιδίου (H3T3rhK4R8) παρεμποδίζει τη σύνδεση αυτή, εξαφανίζοντας εντελώς το φθορισμό, γεγονός που επιβεβαιώνει την ειδικότητα της αντίδρασης.



Εικόνα 56. Δοκιμασία ανταγωνιστικής αναστολής, στα πλαίσια έμμεσου ανοσοφθορισμού, για τον έλεγχο της ειδικότητας του αντισώματος έναντι της H3T3ph. Αριστερά παρουσιάζεται το πεπτίδιο ελέγχου (H3T3K4R8) και δεξιά το πεπτίδιο έναντι του οποίου κατασκευάστηκε το αντίσωμα (H3T3rhK4R8). Η χρώση του DNA έγινε με Propidium Iodide. Scale bars 15μm.

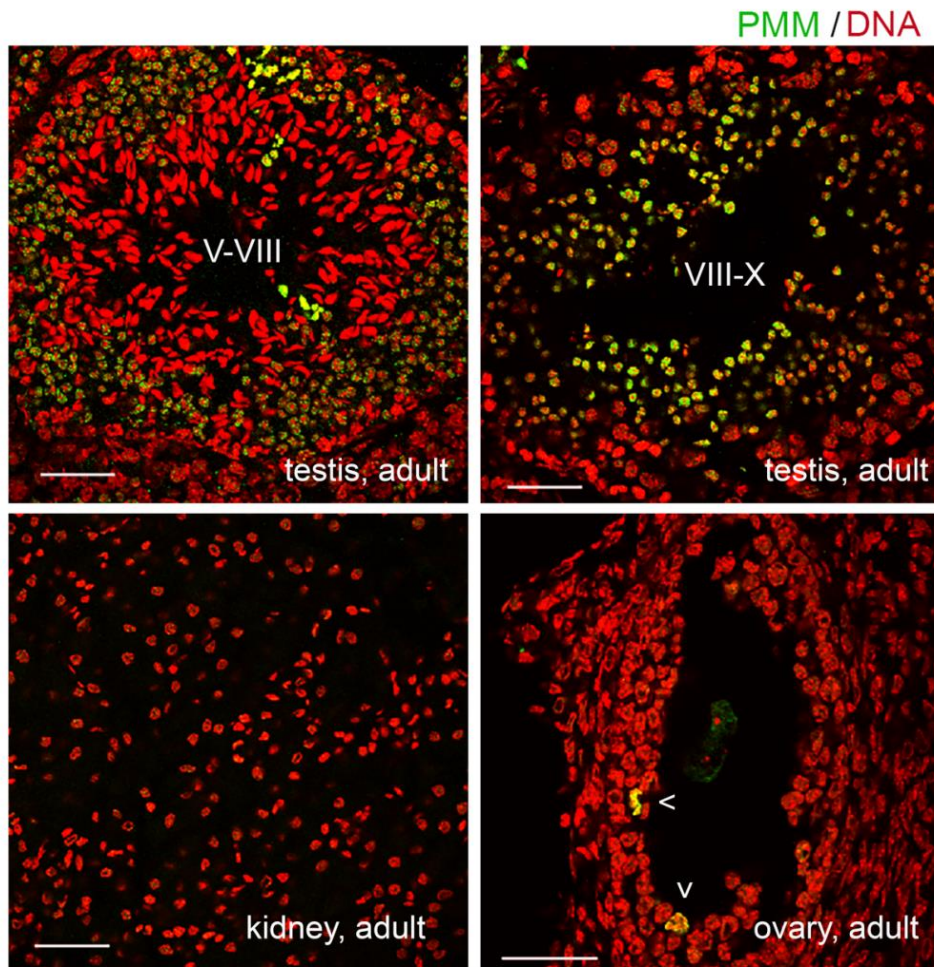
Η αναστολή της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος από το πεπτίδιο που φέρει την τροποποίηση H3T3rhK4R8 είναι δοσο-εξαρτώμενη, όπως φαίνεται μετά από χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του (εικόνα 57). Σε συγκέντρωση πεπτιδίου 0.5μM, παρατηρείται από ελάχιστη έως σχεδόν πλήρης αναστολή, ενώ σε συγκέντρωση 1μM αυτή κυμαίνεται από μέτρια έως πλήρης. Αντίθετα, σε συγκέντρωση 2μM, η αναστολή είναι πλήρης, σε όλες τις περιπτώσεις.



Εικόνα 57. Η αναστολή της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος από το H3T3phK4R8 τροποποιημένο πεπτιδίο είναι δόσο-εξαρτώμενη. Στην εικόνα παρουσιάζονται σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίου VIII (2^ο μισό) έως X. Δοκιμασία ανταγωνιστικής αναστολής παρουσία 0.5μM, 1μM και 2μM πεπτιδίου. Scale bars 20μm.

3.4.3. Η PMM-υπογραφή ($H3T3phK4me_3R8me_2$) ανιχνεύει επίτοπους σε πολύ πρώιμες (βήματα 4-7), σε πρώιμες (βήματα 8-10), αλλά όχι ώριμες σπερματίδες (βήματα 11-16)

Πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού σε τομές κρουστάτη έδειξαν ότι η PMM-υπογραφή εντοπίζεται σε σπερματοφόρα σωληνάρια όρχεως ενήλικου ποντικού, τα οποία ανήκουν στα στάδια V-VIII και VIII-X. Πιο συγκεκριμένα, τα μετα-μειωτικά κύτταρα που έφεραν την τροποποίηση PMM ανήκαν όχι μόνο σε όψιμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες απλοειδείς σπερματίδες (βήματα 8-10), αλλά και σε πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες βήματος 4-7 (εικ. 58). Τελικά διαφοροποιημένα νεφρικά κύτταρα ήταν αρνητικά για την PMM-υπογραφή. Αντίθετα, τα μιτωτικά διαιρούμενα θυλακιοκύτταρα της ωοθήκης ενήλικου ποντικού ήταν θετικά, όπως αναμενόταν (εικ. 58, άσπρα βέλη).

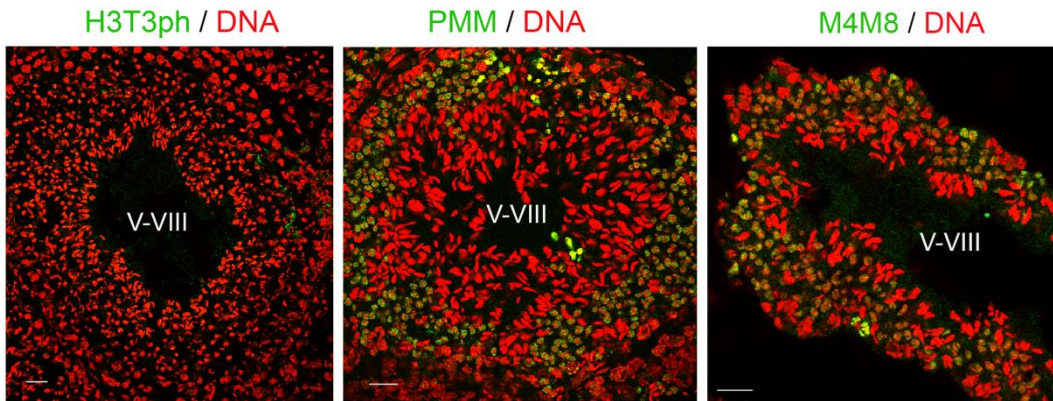


Εικόνα 58. Η PMM-υπογραφή εντοπίζεται σε πρώιμες στρογγυλές (βήματα 4-7) και όψιμες απλοειδείς σπερματίδες (βήματα 8-10). Στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται τομές κρουστάτη από νεφρό και ωοθήκη ενήλικου ποντικού. Με άσπρα βέλη σημειώνονται μιτωτικά θυλακιοκύτταρα ποντικού. Η χρώση του DNA πραγματοποιήθηκε με TO-PRO 3. Scale bars 40µm.

3.4.4. Οι δύο μεθυλιώσεις ($H3K4me_3-H3R8me_2$) εγκαθιδρύονται νωρίτερα από τη φωσφορυλίωση ($H3T3ph$), η οποία ολοκληρώνει την PMM-υπογραφή

Το γεγονός ότι το aPMM αντίσωμα αναγνωρίζει επίτοπους σε πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες δημιούργησε ένα παράδοξο, καθώς σε αυτού του τύπου τα κύτταρα το αντίσωμα έναντι της $H3T3ph$ δεν αναγνωρίζει κανένα επίτοπο (εικ. 59, αριστερά και μέση). Η απουσία της $H3T3ph$ οδήγησε στην υπόθεση ότι στα κύτταρα αυτά υπάρχει ένα τμήμα μόνο της PMM υπογραφής, που περιέχει τις δύο τροποποιήσεις μεθυλίωσης $H3K4me_3-H3R8me_2$. Ως πρώτο βήμα για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της $H3K4me_3R8me_2$ (aM4M8, Markaki et al., 2009⁹⁴), σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίου V-VIII. Όπως φαίνεται και στο δεξί τμήμα της εικόνας 59, το aM4M8 αντίσωμα αναγνώρισε επίτοπους σε πρώιμες

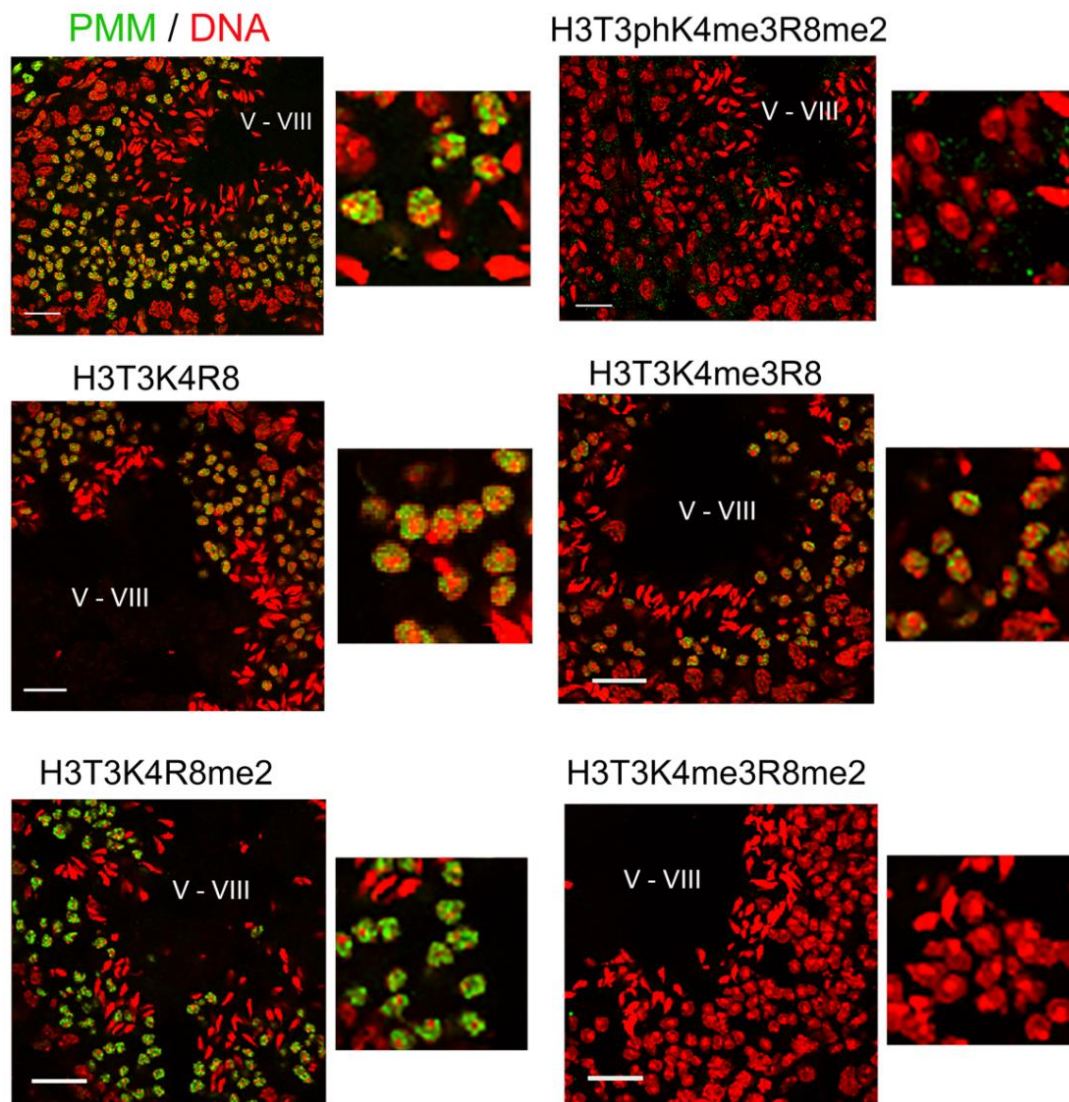
στρογγυλες σπερματίδες αυτών των σταδίων. Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις για τα aH3T3ph και aPMM αντισώματα, το aM4M8 βρέθηκε στις περιοχές «χαλαρής» χρωματίνης των απλοειδών σπερματίδων.



Εικόνα 59. Πρότυπο κατανομής της H3T3ph, της PMM-υπογραφής και της H3K4me₃R8me₂ σε σπερματοφόρα σωληνάρια όρχεως ενήλικου ποντικού σταδίου V-VIII. Αριστερά παρουσιάζεται η χρώση με το αντίσωμα έναντι της H3T3ph (aP3), στη μέση με το αντίσωμα έναντι της τριπλής τροποποίησης (aPMM) και δεξιά με το αντίσωμα έναντι των δύο τροποποιήσεων μεθυλίωσης (aM4M8). Η χρώση του DNA πραγματοποιήθηκε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγιναν νέες δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής (competitive inhibition assays) στα σωληνάρια των ίδιων σταδίων, με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων που περιέχουν συνδυασμούς των τροποποιήσεων μεθυλίωσης. Το σήμα που προέρχεται από το aPMM αντίσωμα είναι ειδικό, καθώς όταν προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης το πεπτίδιο, έναντι του οποίου κατασκευάστηκε το συγκεκριμένο αντίσωμα (H3T3phK4me₃R8me₂), τότε η αλληλεπίδραση παρεμποδίστηκε πλήρως (εικ. 60, πρώτη σειρά). Στα πειράματα αυτά, το πεπτίδιο ελέγχου (μη τροποποιημένο πεπτίδιο, H3T3K4R8) δεν ανέστειλε σε κανένα στάδιο (ή συγκέντρωση) την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος (εικ. 60, δεύτερη σειρά). Δεν παρατηρήθηκε καμία αναστολή όταν προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης πεπτίδιο το οποίο φέρει την H3T3K4R8me₂, ενώ μέτρια αναστολή παρατηρήθηκε με το H3T3K4me₃R8. Αντίθετα, το πεπτίδιο με τις δυο τροποποιήσεις μεθυλίωσης (H3T3K4me₃R8me₂) ανέστειλε πλήρως την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος (εικ. 60, δεύτερη και τρίτη σειρά).

Από τα πειράματα αυτά μπορούν να εξαχθούν δύο σημαντικά συμπεράσματα: α) το aPMM αντίσωμα περιλαμβάνει έναν υποπληθυσμό που αναγνωρίζει μόνο τις μεθυλίώσεις και όχι τη φωσφορυλίωση και β) ότι οι δύο μεθυλίώσεις αυτές (H3K4me₃ και H3R8me₂) εγκαθίστανται νωρίτερα (βήματα 4-7) από τη φωσφορυλίωση (βήματα 8-10) που ολοκληρώνει το μοτίβο PMM, κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης.



Εικόνα 60. Δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής σε σπερματοφόρα σωληνάρια ενήλικου ποντικού σταδίου V-VIII. Επάνω σειρά: Έμμεσος ανοσοφθορισμός με το αPMM αντίσωμα (αριστερά) και δοκιμασία ανταγωνιστικής αναστολής με το ανοσογενές πεπτιδίιο ($H3T3phK4me_3R8me_2$). Στη δεύτερη σειρά παρουσιάζεται το πεπτιδίιο ελέγχου ($H3T3K4R8$, αριστερά) και το πεπτιδίιο $H3T3K4me_3R8$. Στη τρίτη σειρά βρίσκεται το πεπτιδίιο $H3T3K4R8me_2$ (αριστερά) και αυτό που φέρει τις δυο τροποποιήσεις μεθυλίωσης ($H3T3K4me_3R8me_2$). Η χρώση DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20 μ m.

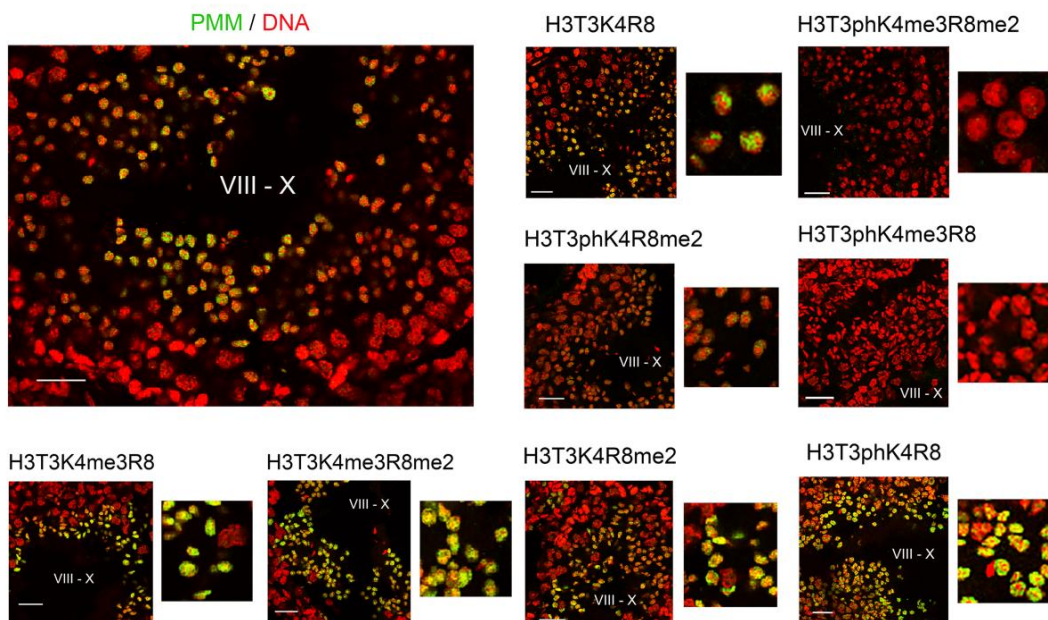
3.4.5. Διαδικοί συνδυασμοί του μοτίβου $H3T3phK4me_3R8me_2$ εμφανίζονται διαδοχικά κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης.

Η εξακρίβωση ότι στα σωληνάρια σταδίων V-VIII υπάρχουν στην πραγματικότητα μόνο οι δυο τροποποιήσεις μεθυλίωσης ($H3K4me_2$ - $H3R8me_2$) δημιούργησε το ερώτημα εάν διαδικοί συνδυασμοί της υπογραφής PMM παρουσιάζονται και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να διαπιστωθεί ποια είναι η χρονολογική σειρά εμφάνισής τους και ποια η φυσιολογική σημασία τους. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν εκ νέου δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής σε τομές όρχεως

ενήλικου ποντικού, παρουσία συνθετικών πεπτιδίων που φέρουν συνδυασμούς τροποποιήσεων του μοτίβου PMM. Στην συνέχεια αποτυπώθηκε το πρότυπο κατανομής των συνδυασμών αυτών σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων VIII-X.

3.4.5.1. Οι συνδυασμοί του μοτίβου PMM στις όψιμες στρογγυλές και τις επιμηκυνόμενες σπερματίδες βήματος 8-10.

Στα σπερματοφόρα σωληνάρια αυτών των σταδίων οι τροποποιήσεις PMM και H3T3ph ανιχνεύονται εκτός των συμπυκνωμένων χρωμοκέντρων των ώριμων απλοειδών σπερματίδων (εικ. 61, αριστερά).



Εικόνα 61. Δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής με πεπτιδία που φέρουν συνδυασμούς του μοτίβου PMM (final concentration 0,5μM), σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίου VIII-X. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Ως πεπτιδία ελέγχου του πειράματος αυτού χρησιμοποιήθηκε το μη τροποποιημένο πεπτιδίο (H3T3K4R8) και το πλήρως τροποποιημένο πεπτιδίο (H3T3phK4me₃R8me₂). Αυτά έδειξαν αντίστοιχα μη αναστολή και πλήρη αναστολή της πρόσδεσης αντιγόνου-αντισώματος (εικ. 61, πρώτη σειρά). Σε πλήρη αναστολή οδήγησε και η προσθήκη του H3T3phK4me₃R8 τροποποιημένου πεπτιδίου στο μίγμα της αντίδρασης. Το H3T3phK4R8me₂ τροποποιημένο πεπτιδίο προκάλεσε επίσης σημαντική αναστολή στην ένταση του σήματος φθορισμού (εικ. 61, δεύτερη σειρά). Αντίθετα, η χρήση του H3T3K4me₃R8me₂ τροποποιημένου πεπτιδίου προκάλεσε μικρές αλλαγές. Η προ-επώαση του αντισώματος με καθένα από τα H3T3phK4R8 και H3T3K4me₃R8 πεπτιδία ξεχωριστά

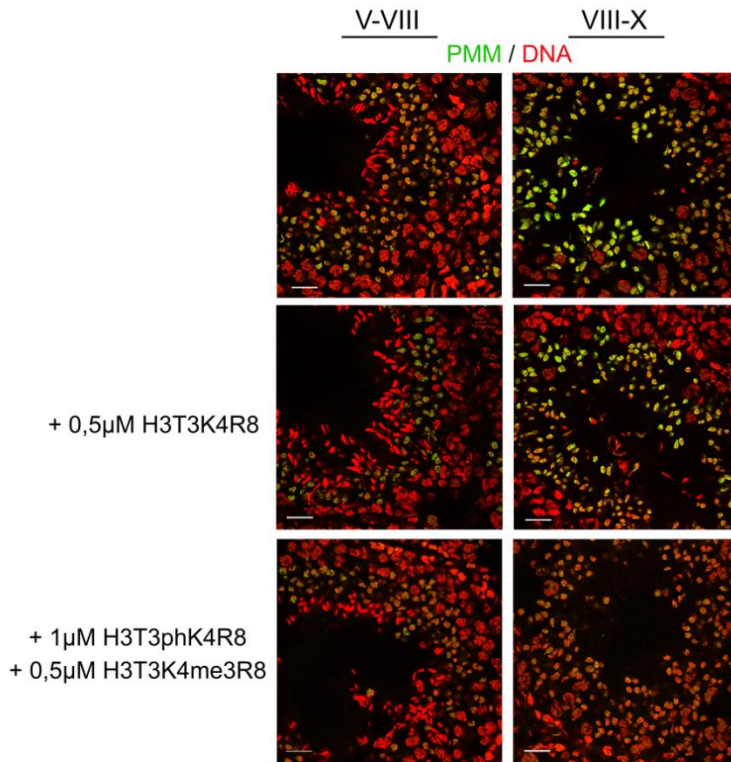
οδήγησε σε μείωση της έντασης του φθορισμού, χωρίς την πλήρη αναστολή της. Όταν όμως το αποτέλεσμα αυτό συγκριθεί με το αντίστοιχο του H3T3K4R8me₂ φαίνεται πως το τελευταίο επηρεάζει περισσότερο τη σχέση αντιγόνου-αντισώματος (εικ. 61, τρίτη σειρά).

Όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενη ενότητα, οι ετεροχρωματινικές περιοχές των πρώιμων στρογγυλών σπερματίδων καταλαμβάνονται από τις δύο τροποποιήσεις μεθυλίωσης της PMM-υπογραφής. Η παρουσία της H3K4me₃ στις στρογγυλές και τις επιμηκυνόμενες σπερματίδες έχει περιγραφεί πολλές φορές στη βιβλιογραφία και συνδέεται με μεταγραφικά ενεργούς υποκινητές^(204, 210, 211). Η διαφορά που παρατηρήθηκε από την προσθήκη των H3T3K4me₃R8 και H3T3K4R8me₃ τροποποιημένων πεπτιδίων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κατανομή τους στις πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες δεν είναι ισότιμη.

Τα ίδια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν και για τις όψιμες στρογγυλές και τις επιμηκυνόμενες σπερματίδες. Τα αποτελέσματα της αναστολής από τα διπλά-τροποποιημένα πεπτιδία (H3T3rhK4me₃R8, H3T3K4me₃R8me₂ και H3T3rhK4R8me₂) δείχνουν πως η συμβολή της φωσφορυλιωμένης θρεονίνης 3 είναι μεγαλύτερη από αυτή των δυο μεθυλίώσεων, στη λυσίνη 4 και την αργινίνη 8 της ιστόνης H3, για τις σπερματίδες βήματος 8-10. Η αναστολή από τα μονά-τροποποιημένα πεπτιδία (H3T3rhK4R8, H3T3K4me₃R8 και H3T3K4R8me₂) δείχνει ότι στο στάδιο αυτό, μεταξύ των δύο μεθυλίώσεων, η συμβολή της αργινίνης 8 υπερβαίνει αυτή της λυσίνης 4.

3.4.5.2. Το H3T3rhK4me₃-τροποποιημένο πεπτιδίο έχει υψηλή συγγένειά για το aPMM αντίσωμα

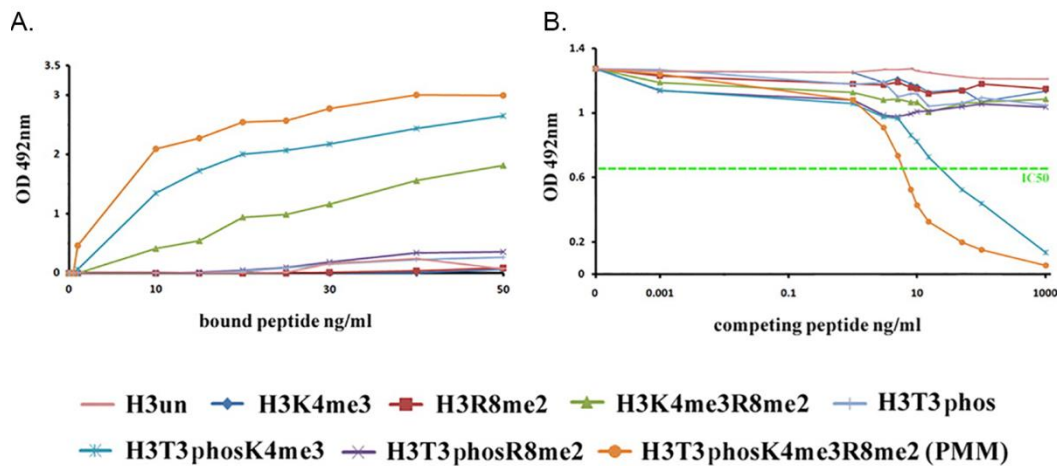
Τα πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής ταυτοποίησαν την παρουσία παραλλαγών του μοτίβου PMM στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, κατά τη σπερμιογένεση. Στις πρώιμες απλοειδείς σπερματίδες (στάδια V-VIII) βρέθηκαν να συνυπάρχουν οι H3K4me₃ και H3R8me₂. Στις όψιμες απλοειδείς σπερματίδες (στάδια VIII-X) αναγνωρίστηκε επιπλέον η H3T3rh, μαζί με τις H3K4me₃ και H3R8me₂. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ανταγωνιστικής αναστολής το H3T3rhK4me₃R8 τροποποιημένο πεπτιδίο ανέστειλε πλήρως τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος σε όλα τα στάδια (V-VIII και VIII-X). Είναι γνωστό ωστόσο, από προηγούμενα πειράματα, ότι η H3T3rh δεν ανιχνεύεται στις πρώιμες απλοειδείς σπερματίδες και ότι η H3R8me₂ υπάρχει και στις δυο κατηγορίες σπερματίδων. Συνεπώς στις δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής το H3T3rhK4me₃R8 τροποποιημένο πεπτιδίο δεν θα έπρεπε να αναστέλλει τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος σε καμία περίπτωση. Για τη διευκρίνιση αυτών των παρατηρήσεων τα πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής επαναλήφθηκαν με τη χρήση μίγματος μονά-τροποποιημένων πεπτιδίων (H3T3rhK4R8 και H3T3K4me₃R8) σε όλα στα στάδια.



Εικόνα 62. Δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής με χρήση των τροποποιημένων πεπτιδίων H3T3rhK4R8 και H3T3K4me₃R8 στο ίδιο μίγμα αντίδρασης. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20µm.

Τα αποτελέσματα της εικόνας 62 δείχνουν πως παρουσία μίγματος των δυο πεπτιδίων (H3T3rhK4R8, H3T3K4me₃R8), αντί του διπλά τροποποιημένου H3T3rhK4me₃R8, η ένταση του σήματος φθορισμού από το aPMM αντίσωμα μειώνεται αισθητά, χωρίς όμως να εξαλείφεται πλήρως σε όλα τα στάδια. Ο υπολειπόμενος φθορισμός είναι δυνατόν να αποδοθεί στην παρουσία της H3R8me₂, τόσο στα στάδια V-VIII, όσο και στα στάδια VIII-X (εικ. 62, τρίτη σειρά).

Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με την απουσία πλήρους αναστολής της σύνδεσης του aPMM αντισώματος: α) από το H3T3K4me₃R8 τροποποιημένο πεπτίδιο στα στάδια V-VIII (εικόνα 60, δεύτερη σειρά) και VIII-X (εικ. 61, τρίτη σειρά) και β) από το H3T3rhK4R8 τροποποιημένο πεπτίδιο στα στάδια VIII-X (εικ. 61, τρίτη σειρά). Ακόμη, προηγούμενα δεδομένα (Markaki et al., 2009⁹⁴) από πειράματα ανταγωνιστικής ELISA (εικ. 63^B), δείχνουν ότι το aPMM αντίσωμα είναι δυνατό να εκτοπιστεί από το ακινητοποιημένο υπόστρωμα του μόνο από τα πεπτίδια H3T3rhK4me₃R8me₂ (πορτοκαλί) και H3T3rhK4me₃R8 (μπλε). Επομένως η πλήρης αναστολή της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος (aPMM) από το H3T3rhK4me₃R8 τροποποιημένο πεπτίδιο, στα στάδια V-VIII και VIII-X, δεν οφείλεται στην απουσία της H3R8me₂ από τα κύτταρα αυτά.

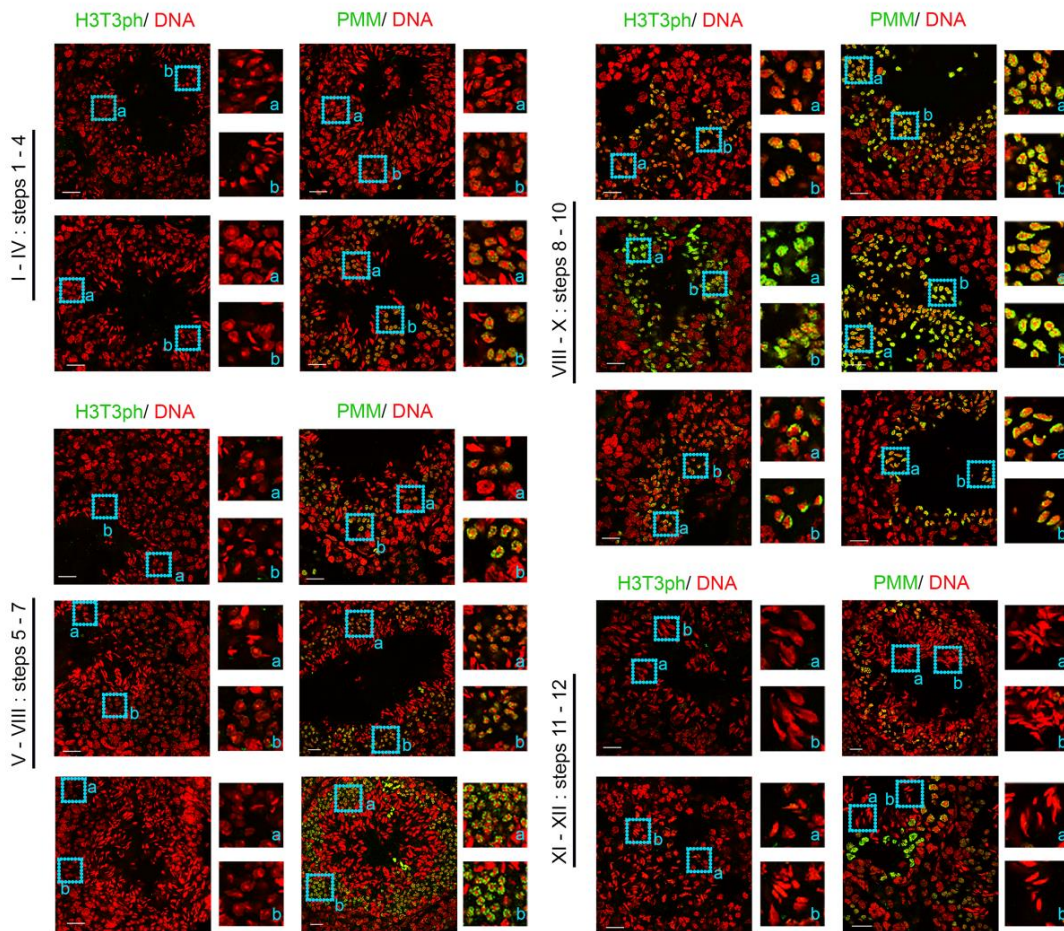


Εικόνα 63. Δοκιμασίες ELISA και ανταγωνιστικής ELISA για τον έλεγχο της ειδικότητας του aPMM αντισώματος, με χρήση συνθετικών πεπτιδίων. Μικρή αντίδραση παρατηρείται με το M4M8 πεπτίδιο (H3T3K4me₃R8me₂), ενώ τα πεπτίδια P3 (H3T3phK4R8), P3M8 (H3T3phK4R8me₃) καθώς και η μη τροποποιημένη ιστόνη H3 (recH3, H3T3K4R8) δεν έδωσαν καμία αντίδραση. Όταν οι δοκιμασίες επαναλήφθηκαν σε ανταγωνιστική μορφή μόνο τα PMM (H3T3phK4me₃R8me₂) και P3M4 (H3T3phK4me₃R8) πεπτίδια έδειξαν ικανότητα να εκτοπίζουν το aPMM αντίσωμα από το ακινητοποιημένο υπόστρωμά του⁽⁹⁴⁾.

3.4.6. Οι τροποποιήσεις H3T3ph και PMM καταλαμβάνουν συγκεκριμένη θέση στη χρωματίνη των συμπυκνωμένων απλοειδών σπερματιδίων

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο, μια πιο λεπτομερής εξέταση των δειγμάτων έδειξε πως τόσο η H3T3ph, όσο και το PMM είναι αποκλεισμένα από τα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα (βλέπε εικ. 54 και 58). Τα τελευταία σχηματίζονται στις πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες (βήμα 1) και απαρτίζονται από την περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων.

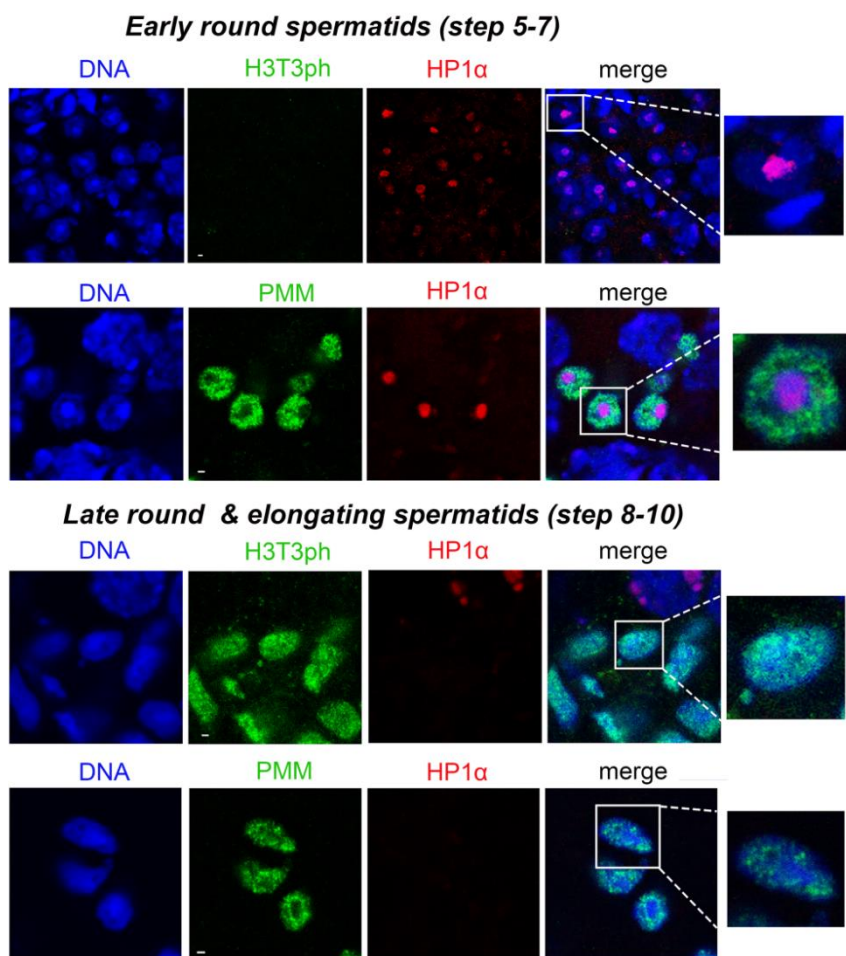
Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια μεταβολή στην κατανομή των υπό μελέτη τροποποιήσεων από τις συμπυκνωμένες περικεντρομεριδιακές περιοχές κατά τη δεύτερη μειωτική διαίρεση (βλέπε εικ. 52-54), στις «χαλαρές» ευχρωματικές των απλοειδών σπερματιδίων. Ακόμη, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μεταξύ των δυο αυτών θέσεων μεσολαβεί ένα διάστημα κατά το οποίο ούτε η H3T3ph, αλλά ούτε και το PMM είναι παρόντα στα απλοειδή σπερματοκύτταρα. Το διάστημα αυτό αναφέρεται στις πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες βήματος 1 έως 4 που συναντώνται σε σωληνάρια σταδίων I-IV. Στην εικόνα που ακολουθεί, παρατίθεται αναλυτικά το πρότυπο κατανομής των H3T3ph και PMM, σε όλα τα στάδια της σπερματογένεσης του ποντικού (εικ. 64).



Εικόνα 64. Απεικόνιση του χρονικού περιθωρίου εμφάνισης και απομάκρυνσης της H3T3ph και του μοτίβου PMM κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης του ποντικού, μετά από έμμεσο ανοσοφθορισμό με τα αντίστοιχα αντισώματα. Η χρώση DNA πραγματοποιήθηκε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm. Οι λατινικοί αριθμοί αντιπροσωπεύουν τα στάδια της σπερματογένεσης και οι αραβικοί τα βήματα της σπερμιογένεσης.

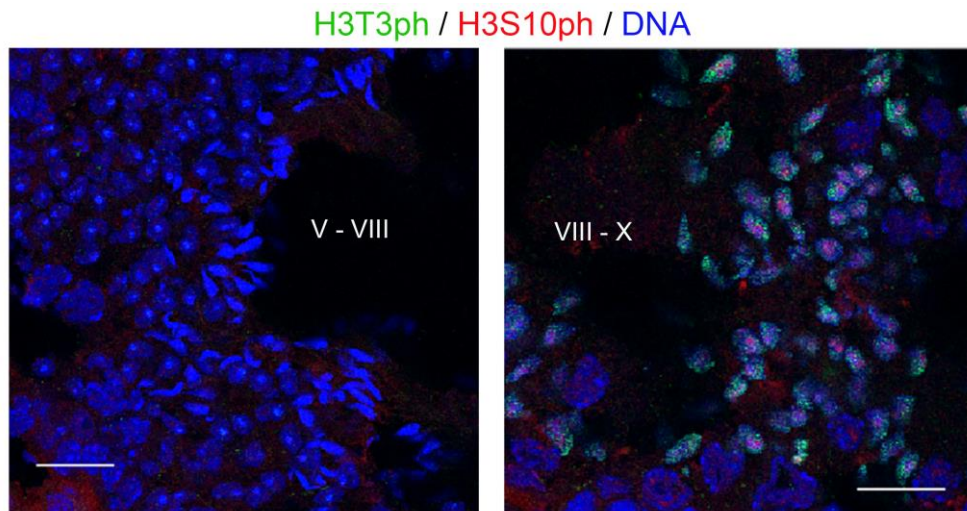
Κατόπιν αυτού, κρίθηκε σκόπιμο να αποτυπωθεί η κατανομή και άλλων ενεργοποιητικών ή/και κατασταλτικών τροποποιήσεων στις απλοειδείς σπερματίδες. Πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές όρχεως ενήλικου ποντικού και ελέγχθηκε ο συσχετισμός τροποποιήσεων του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης H3 σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων V-VIII και VIII-X.

Τα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα των πρώιμων απλοειδών σπερματίδων (V-VIII), από τα οποία απουσίαζε η H3T3ph, περιείχαν HP1α (εικ. 65, πάνω). Το αντίθετο παρατηρήθηκε για τις ώριμες απλοειδείς σπερματίδες των σταδίων (VIII-X, εικ. 65, κάτω).

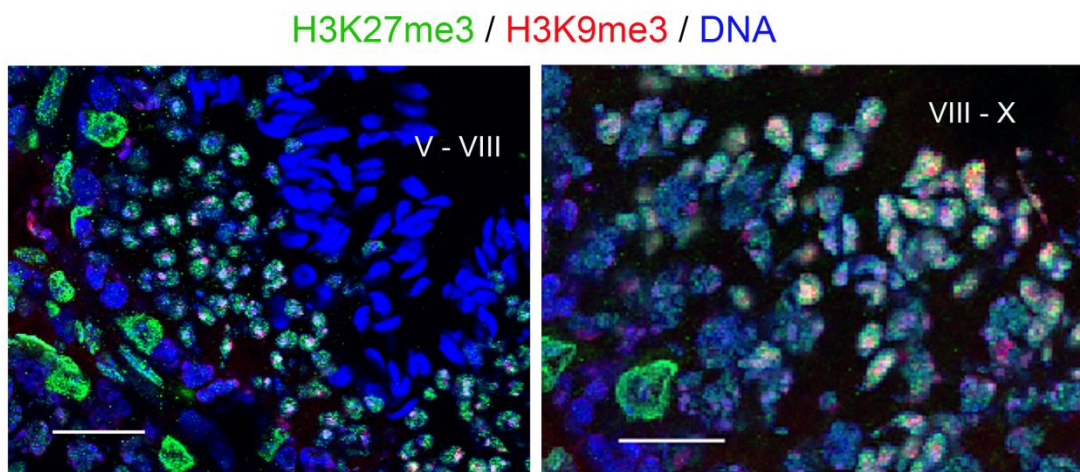


Εικόνα 65. Η H3T3ph και το μοτίβο PMM κατανέμονται στις περιοχές «χαλαρής» χρωματίνης των απλοειδών σπερματίδων. Αντίθετα, η HP1α βρίσκεται στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα. Δείγματα από έμμεσο ανοσοφθορισμό με τα αντίστοιχα αντισώματα και χρώση του DNA με TO-PRO 3. Scale bars 1μm.

Η παρουσία της H3S10ph στη μειωτική διαίρεση έχει περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Ωστόσο σε αντίθεση με αυτά που έχουν περιγραφεί, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές όρχεως ενήλικου ποντικού αποκάλυψε την παρουσία της σε μετα-μειωτικές σπερματίδες. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 66, η H3S10ph, ενώ απουσίαζε από τα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα των πρώιμων στρογγυλών σπερματίδων (εικ. 66, αριστερά), εντοπίστηκε σε αυτά των στρογγυλών και επιμηκυνόμενων σπερματίδων βήματος 8-10 (εικ. 66, δεξιά).



Εικόνα 66. Σχετική κατανομή των H3T3ph και H3S10ph σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων VI-VIII (αριστερά) και VIII-X (δεξιά), μετά από διπλό ανοσοφθορισμό. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

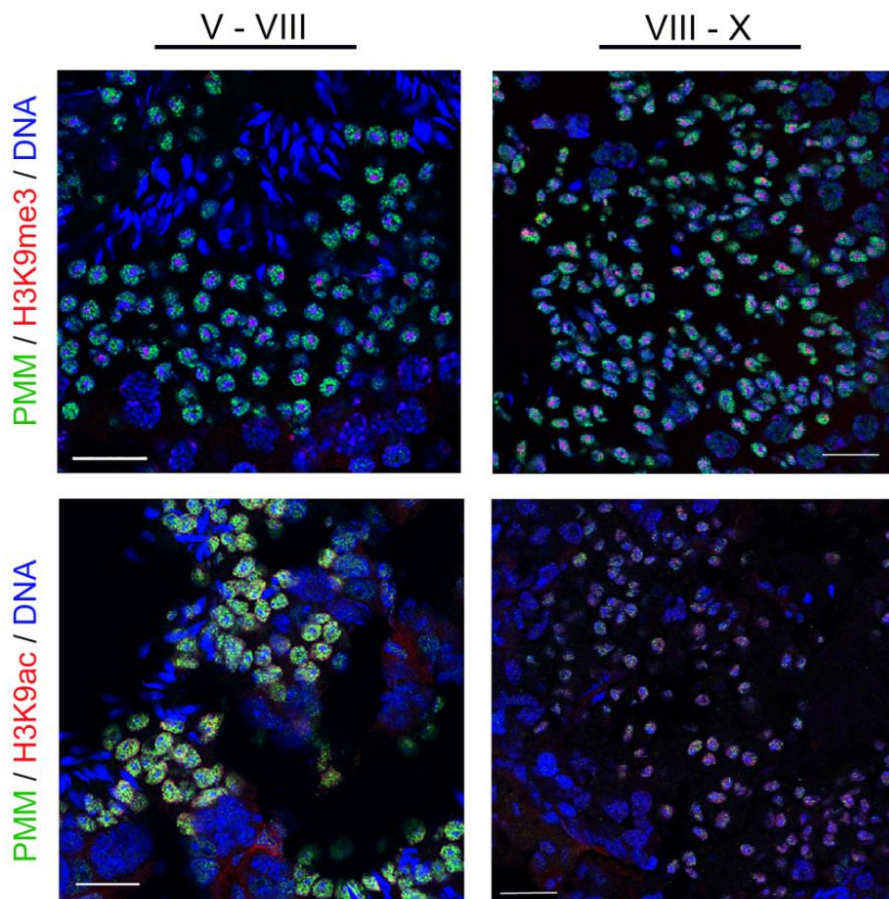


Εικόνα 67. Σχετική κατανομή μεταξύ των H3K27me₃ και H3K9me₃ σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων VI-VIII (αριστερά) και VIII-X (δεξιά). Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Σύμφωνα με όσα έχουν περιγραφεί, η H3K27me₃ εντοπίστηκε σε σπερματογόνια τύπου A και σπερματοκύτταρα στη φάση της λεπποταινίας-παχυταινίας σε σωληνάρια σταδίου V-VIII⁽²⁰⁴⁾. Βρέθηκε ακόμη να καταλαμβάνει περιοχές μη συμπυκνωμένης χρωματίνης σε στρογγυλές σπερματίδες βήματος 6-8 και επιμηκυνόμενες σπερματίδες βήματος 10, όμοια με τις H3T3ph και PMM (εικ. 67).

Η παρουσία της H3K9me₃ στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα απλοειδών σπερματίδων όλων των υπό μελέτη σταδίων (V-VIII και VIII-X) συμφωνεί με τα δημοσιευμένα βιβλιογραφικά δεδομένα^(205, 206) (εικ. 67-68, πάνω). Όπως είναι αναμενόμενο, η παρουσία της H3K9me₃ και της HP1α στις πρώιμες στρογγυλές

σπερματίδες συνδέεται με την απενεργοποίηση γονιδίων στη συμπυκνωμένη ετεροχρωματίνη⁽²⁰⁷⁻²⁰⁹⁾. Τέλος, διπλός ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι του μοτίβου PMM και της H3K9ac αποκάλυψε ότι οι δύο τροποποιήσεις συνυπάρχουν στις περιοχές μη συμπυκνωμένης χρωματίνης των απλοειδών σπερματίδων σταδίων V-VIII και VIII-X (εικ. 68, κάτω).



Εικόνα 68. Κατανομή των PMM, H3K9me₃ και H3K9ac στις απλοειδείς σπερματίδες. Η χρώση του DNA έγινε με TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Συνοψίζοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις, γίνεται εμφανές ότι η PMM-υπογραφή σε όλα τα στάδια που μελετήθηκαν και η H3T3rh στους όψιμους κυτταρικούς τύπους, συναντώνται σε περιοχές χρωματίνης στις οποίες έχει πρόσβαση ο μεταγραφικός μηχανισμός των κυττάρων αυτών. Ακόμη, είναι πιθανό οι περιοχές αυτές να επισημαίνουν γονίδια που υφίστανται γενωμική αποτύπωση (genome imprinting), μέσω αμφίσημων τροποποιήσεων (bivalent chromatin domains), έως ότου εκφραστούν στο ζυγωτό.

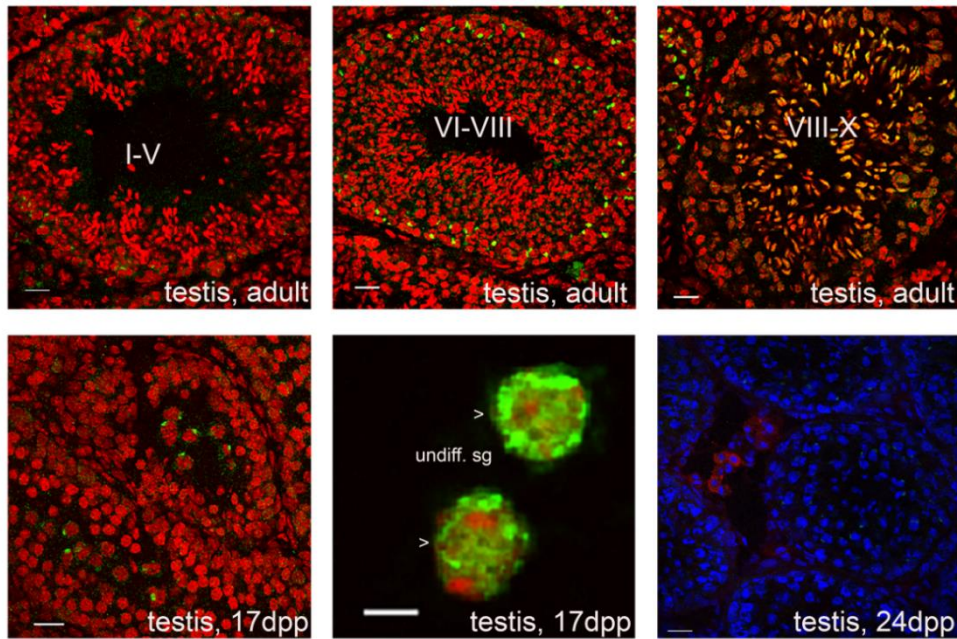
3.4.7. Τα ειδικά για τη σπερματογένεση *Scml2* και *Dazl*, των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται απουσία της *Haspin*, συνυπάρχουν με την *H3T3ph* στις όψιμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες απλοειδείς σπερματίδες σωληναρίων σταδίου VIII-X.

Τα ευρήματα των τελευταίων ετών υποδηλώνουν ότι ο λειτουργικός ρόλος της *Haspin* είναι διαφορετικός στη μίτωση των σωματικών κυττάρων από τις μειωτικές διαιρέσεις των ωοκυττάρων και των απλοειδών σπερματίδων της αρσενικής γαμετικής σειράς. Η διαταραχή των επιπέδων της *Haspin* δεν επιφέρει δραματικές αλλαγές στην ολοκλήρωση της μίωτικής διαίρεσης^(88, 94). Επιπλέον, εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που υπερ-εκφράζουν τη *Haspin* ή δε διαθέτουν το αντίστοιχο γονίδιο πολλαπλασιάζονται κανονικά υπό *in vitro* συνθήκες και σχηματίζουν άρτια εμβρυοειδή σωματίδια, όταν επαχθεί η διαφοροποίησή τους (εικ. 39^A, Καράνικα Ε., Διδακτορική Διατριβή²¹²). Αντίθετα, η απαλοιφή του γονιδίου της *Haspin* από τα ποντίκια (*Haspin* knockout mice) προκαλεί φαινότυπο που περιλαμβάνει ορισμένες ατυπίες στα κύτταρα του όρχεως (σπερματίδες), μέσα στα πλαίσια μιας φυσιολογικής κατά τα λοιπά ανάπτυξης⁽²¹³⁾.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αλληλούχισης RNA νέας γενεάς (εικ. 42^{A, B}) δείχνουν ότι η απαλοιφή του γονιδίου της *Haspin*, αλλά και η υπερέκφρασή της σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τη σπερματογένεση και τη λειτουργία του όρχεως, όπως τα *NFX3*, *FKBP6*, *SOHLH2*, *UTY*, *ZFY1/2*, *UBE1Y1*, *SCML2* και *DAZL*.

Το *Scml2* είναι η ειδική για τη σπερματογένεση υπομονάδα του Polycomb repressive complex 1 (PRC1). Στον όρχι ενήλικων ποντικών εντοπίζεται στα *PLZF*⁺, αδιαφοροποίητα σπερματογόνια. Εκεί, συνδέεται σε υποκινητές που φέρουν *H3K4me_{2/3}* και εγκαθιστά την *H3K27me₃*. Με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιεί αμφίσημες τροποποιήσεις για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με της σπερματογένεσης, αλλά και σωματικών γονιδίων^(214, 215). Κατά τη διάρκεια της μείωσης, συναντάται στα φυλετικά χρωμοσώματα, από το μέσο της παχυταινίας έως τη διπλοταινία, καθιστώντας τα μεταγραφικά ανενεργά σε συνεργασία με την γ H₂Ax. Στόχος του είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, με δυο διακριτούς αλλά αντίθετους μηχανισμούς. Σε συνεργασία με το PRC1 συμμετέχει στην RNF2-εξαρτώμενη ουβικιτινίωση της H2A, με στόχο την καταστολή σωματικών και γονιδίων που εκφράζονται στα πρόδρομα γαμετοκύτταρα. Επιπλέον,, αποτρέπει την RNF2-εξαρτώμενη ουβικιτινίωση της H2A κατά τη διάρκεια της μείωσης, επιτρέποντας έτσι τον επιγενετικό προγραμματισμό των φυλετικών χρωμοσωμάτων^(216, 217).

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της *Haspin* στον επιγενετικό έλεγχο που ασκεί το *Scml2* πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές όρχεως ενήλικου και νεαρού ποντικού για να εξακριβωθεί το πρότυπο κατανομής του (εικ. 69).



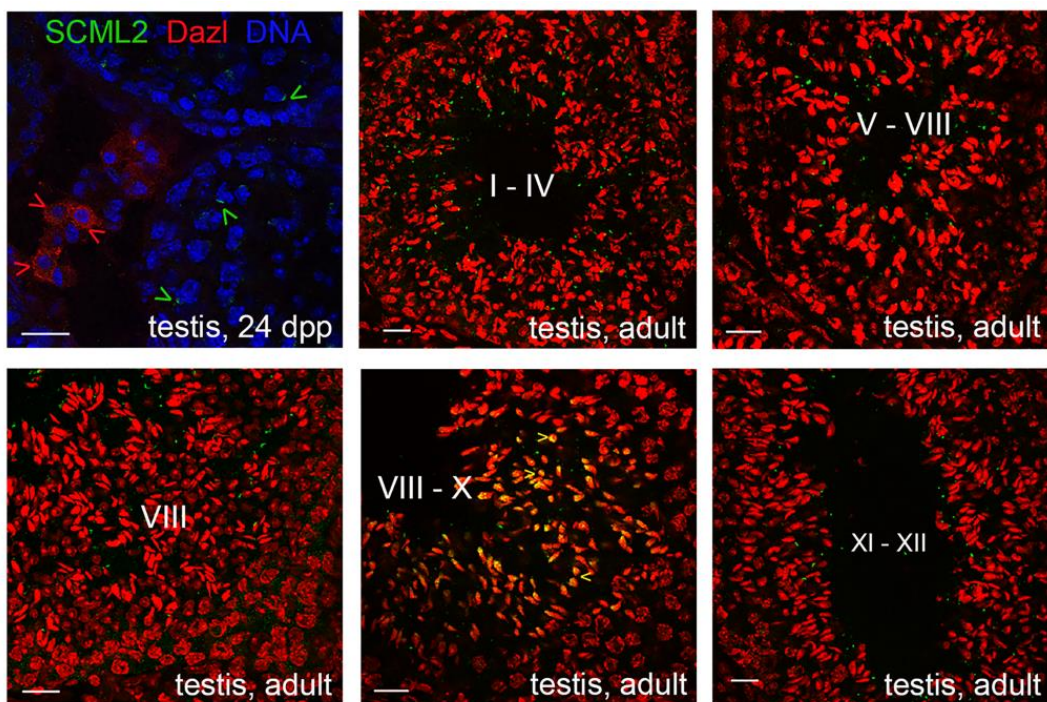
Εικόνα 69. Αποτύπωση προτύπου κατανομής του *Scml2* σε όρχι νεαρού (17dpp, 24dpp) και ενήλικου (adult) ποντικού. Στην πάνω σειρά απεικονίζονται σπερματοφόρα σωληνάρια από όρχεις ενήλικου ποντικού και στην κάτω από ποντικούς 17 και 24 ημερών. Στο κέντρο της κάτω σειράς παρουσιάζονται αδιαφοροποίητα σπερματογόνια (undiff. Sg) σε ποντίκι 17 ημερών. Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι του *Scml2* (πράσινο)⁽²¹⁶⁾ και του *Dazl* (κόκκινο). Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε TO-PRO 3. Scale bars 5μm για τα αδιαφοροποίητα σπερματογόνια και 20μm για τις υπόλοιπες εικόνες.

Σε συμφωνία με τις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές, το *Scml2* εντοπίστηκε στο σωματίο XY μειωτικών σπερματοκυττάρων, στο στάδιο λεπτοταινίας-πρώιμης παχυταινίας νεαρών ποντικών 17 ημερών και ώριμων ποντικών (σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων I-IV και V-VIII). Ο εντοπισμός του σε στρογγυλές και επιμηκυνόμενες απλοειδείς σπερματίδες (σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίου VIII-X) είναι κάτι που δεν αναφέρεται ως τώρα στη βιβλιογραφία, εκτός από τη δημοσίευση των Luo et al., 2015⁽²¹⁷⁾. Για την αποτύπωση της κατανομής του σε σπερματοφόρα σωληνάρια σταδίων VIII-X χρειάστηκε αύξηση του χρόνου μονιμοποίησης των δειγμάτων. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως η πρωτεΐνη αυτή να υπάρχει σε μικρότερες ποσότητες στις απλοειδείς σπερματίδες, από τα μειωτικά σπερματοκύτταρα.

Το *Dazl* (Deleted in Azoospermia-Like) συναντάται σε αρσενικά και θηλυκά γαμετοκύτταρα. Βρίσκεται επίσης στο κυτταρόπλασμα βλαστικών κυττάρων, όπου συνδέεται με τη μεταγραφική ρύθμιση των *Sox2*, *Mvh* και *Oct3/4*⁽²¹⁹⁾. Αποτελεί ένα παράγοντα προώθησης των μειωτικών διαιρέσεων, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μειορύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία⁽²²⁰⁾. Στα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα ενεργοποιείται μετά από μετατροπή του 5'mC (5' methylated cytosine) σε 5'hmC (5' hydroxyl-methylated cytosine), μέσω των TET1/TET2⁽²²¹⁾. Δρα ως θετικός μετα-

μεταγραφικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης σε γονίδια όπως είναι τα PIWIL2, TDRD9, DNMT1, DNMT3B, ATM, DMRT1, NXF2, SOHLH2, SOX3, PLZF/ZBTB16 και TAF4B⁽²²²⁾. Η υπερέκφρασή του σε mGSC's τα οποία προέρχονται από κατσίκες γαλακτοπαραγωγικών φυλών (dairy goat male Germline Stem Cells) βρέθηκε να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μειωτική διαίρεση, όπως είναι τα STRA8, SCP3, CDC25A, CDC2 και VAS⁽²²³⁾.

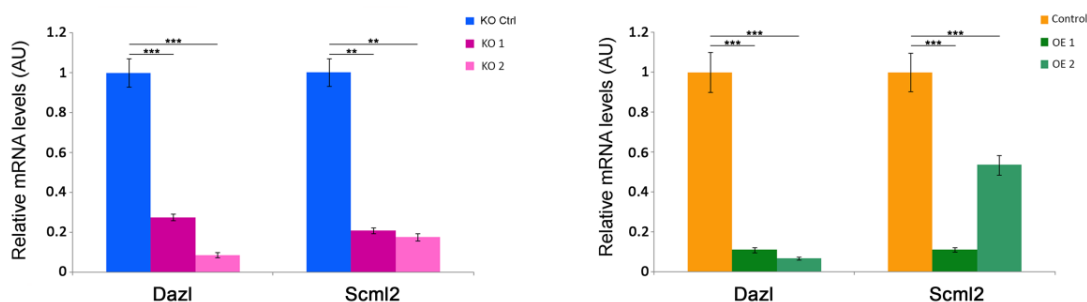
Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με τη χρήση δυο διαφορετικών αντισωμάτων, ώστε να αποτυπωθεί το πρότυπο κατανομής και αυτού του παράγοντα σε όρχεις ποντικού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 70, το Dazl είναι κυτταροπλασματικό σε σπερματογόνια ποντικού 17 ημερών (πάνω αριστερά, κόκκινα βέλη). Στους ενήλικους ποντικούς εντοπίστηκε στον πυρήνα στρογγυλών και επιμηκυνόμενων απλοειδών σπερματίδων (στάδια VIII-X, κάτω σειρά, στο κέντρο), όπως ακριβώς και η H3T3ph.



Εικόνα 70. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του Dazl σε όρχεις νεαρού (24dpp) και ενήλικου (adult) ποντικού, μετά από δοκιμασίες έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αριστερά (πάνω σειρά) διακρίνονται διαφοροποιούμενα σπερματογόνια στο περιθώριο ενός σωληναρίου. Με κόκκινα βέλη σημειώνεται το Dazl και με πράσινα το Scml2. Οι υπόλοιπες εικόνες δείχνουν τον εντοπισμό του στους ενήλικους ποντικούς. Στο κέντρο της κάτω σειράς φαίνεται η χρώση σε απλοειδείς σπερματίδες βήματος 8-10 (στάδια VIII-X). Για την χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε TO-PRO 3. Scale bars 20μm.

Η συνύπαρξη της H3T3ph και της τριπλής τροποποίησης PMM, με το Scml2 και το Dazl στις ευχρωματικές περιοχές όσιμων στρογγυλών και επιμηκυνόμενων απλοειδών σπερματίδων επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι η Haspin είναι δυνατόν να συμμετέχει στον

έλεγχο της έκφρασης ειδικών για τη σπερματογένεση γονιδίων στα κύτταρα όπου εκφράζεται. Συνηγορητικά προς τα παραπάνω, τόσο η υπερέκφραση όσο και η απαλοιφή του γονιδίου της *Haspin* σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού επηρεάζει την έκφρασή τους (εικ. 71).



Εικόνα 71. Η υπερέκφραση (*OE*, *overexpression*) και η απαλοιφή (*KO*, *knockout*) του γονιδίου της *Haspin* επηρεάζουν την έκφραση των ειδικών για τη σπερματογένεση γονιδίων *Scml2* και *Dazl*. Τα διαγράμματα δείχνουν τα σχετικά επίπεδα mRNA των *Scml2* και *Dazl* σε κλώνους *Haspin* *KO* και *OE*, όπως αυτά καταγράφηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Στην εικόνα συμπεριλαμβάνεται το τυπικό σφάλμα (*standard error bars*) και οι τρεις αστερίσκοι αντιστοιχούν σε $p \leq 0.001$. (Τα πειράματα qPCR πραγματοποιήθηκαν από τη Δρ. Σουψανά Αικατερίνη).

3.5. Η *Haspin* ως ρυθμιστής της σπερματογένεσης

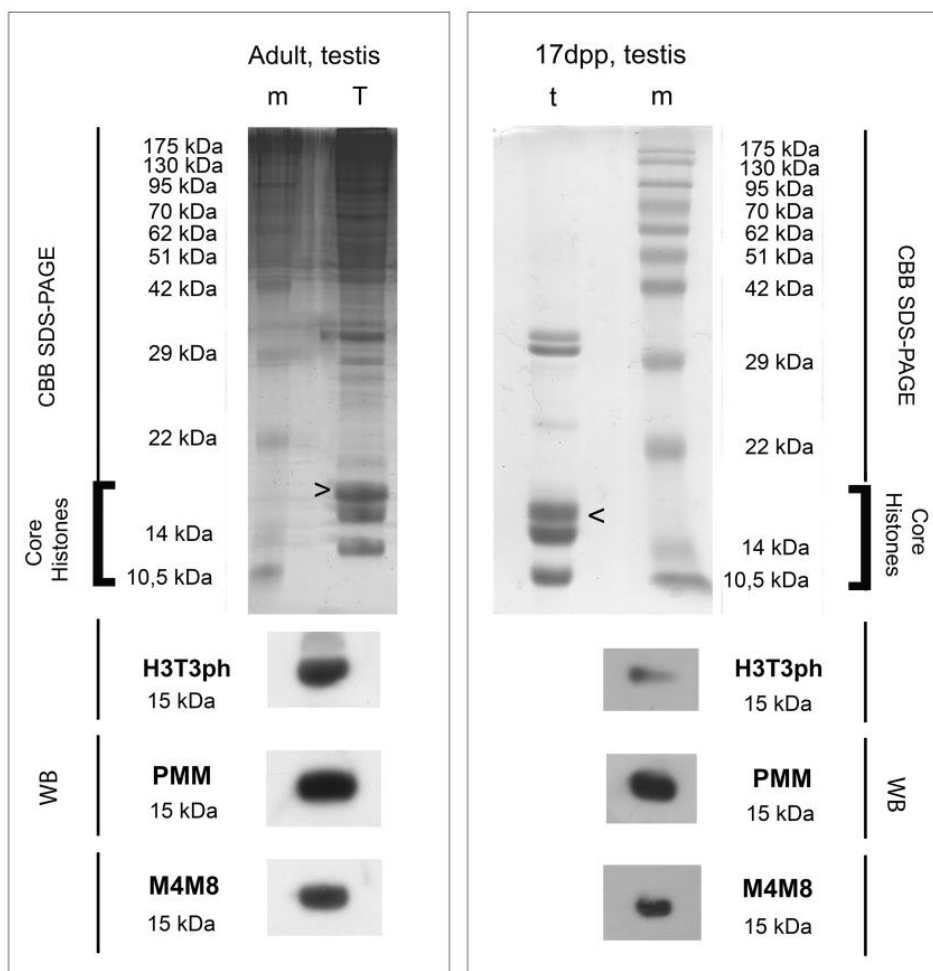
3.5.1. Τα εκχυλίσματα ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ενήλικου ποντικού φέρουν τις τροποποιήσεις *H3T3rh*, *H3T3rhK4me₃R8me₂* και *H3K4me₃R8me₂*

Στη συνέχεια εξετάστηκε η παρουσία συνδυασμών του μοτίβου *PMM*, καθώς επίσης και άλλων τροποποιήσεων του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης *H3* π.χ. *H3Q5ser*, *H3T6rh*, *H3K9me₃*, *H3S10ph*, *H3T11ph*^(201, 224, 225), οι οποίες μπορεί να συμμετέχουν στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης κατά τη σπερμιόγνεση. Στα πλαίσια της διερεύνησης της υπόθεσης εργασίας πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης από εκχυλίσματα ολικών ιστονών ιστού όρχεως ενήλικου ποντικού.

Ως ένα πρώτο βήμα προς την κατεύθυνση αυτή απομονώθηκαν πυρήνες από ποντικούς ηλικίας 17 ημερών και ενήλικους ποντικούς, οι οποίοι στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες εκχύλισης ολικών ιστονών. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο οι νεαροί ποντικοί αυτής της ηλικίας (17dpp) βρίσκονται στην πρόφαση της μειωτικής διαίρεσης και άρα τα μόνα κύτταρα που φέρουν τις τροποποιήσεις *H3T3rh* και *H3T3rhK4me₃R8me₂* είναι τα μιτωτικά. Αντίθετα, στους ενήλικους ποντικούς η ανάπτυξη του επιθηλίου έχει ολοκληρωθεί και επομένως υπάρχουν όλοι οι κυτταρικοί τύποι που φέρουν τα παραπάνω μοτίβα (προ-μειωτικοί, μειωτικοί και μετα-μειωτικοί). Από τις τεχνικές που δοκιμάστηκαν επιλέχθηκε η μέθοδος απομόνωσης με 0.5N HCl, έναντι

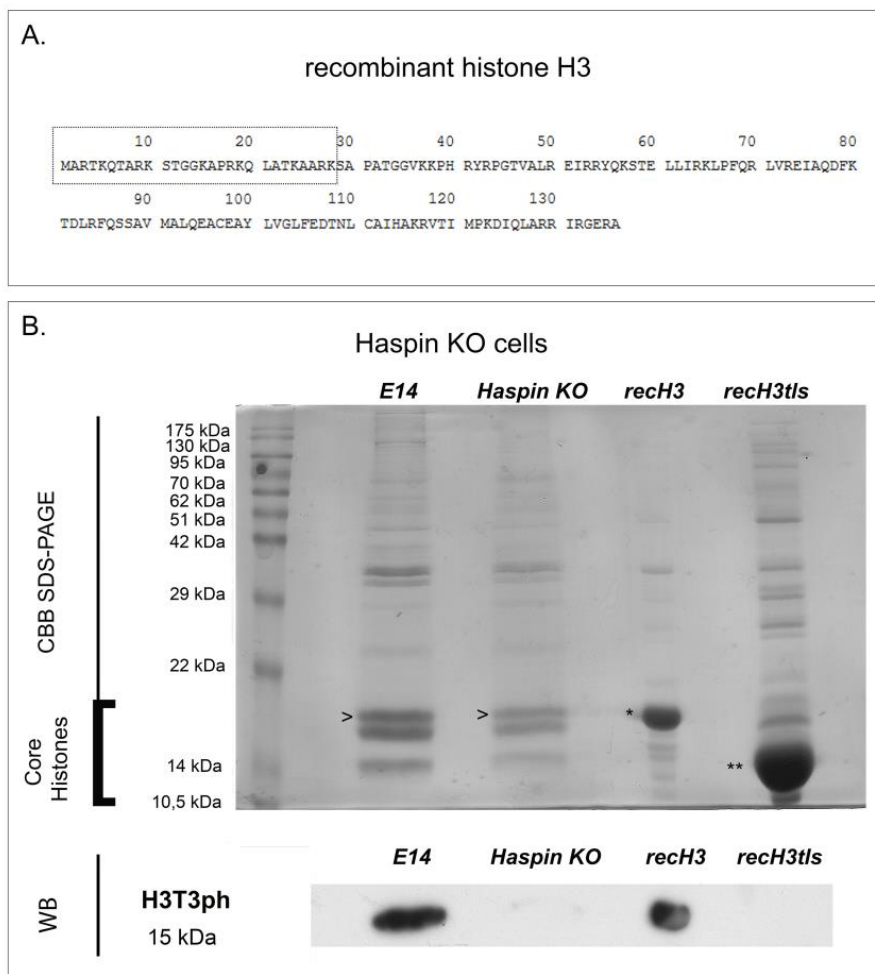
των υπόλοιπων (0.4N H₂SO₄ ή 2.5M NaCl), καθώς είχε την καλύτερη απόδοση σε ποσοστό απομονωμένων ολικών ιστονών στο διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο έναντι αδιάλυτου ιζήματος).

Στην εικόνα 72 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε εκχυλίσματα ολικών ιστονών νεαρών και ενήλικων ποντικών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν πως οι υπό μελέτη τροποποιήσεις διατηρούνται σε συνθήκες όξινης εκχύλισης, σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εξετάστηκαν (όρχεις ποντικών 17dpp και ενήλικων ποντικών). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι ένα ποσοστό του σήματος προέρχεται και από μιτωτικά διαιρούμενα σωματικά κύτταρα εντός του επιθηλίου του όρχεως, όπως είναι τα Sertoli, τα Leydig, τα αγγειακά επιθηλιακά κ.α. Ωστόσο, ο αριθμός των κυττάρων αυτών είναι κατά πολύ μικρότερος σε σύγκριση με αυτόν των γαμετικών κυττάρων.



Εικόνα 72. Εκχύλιση ολικών ιστονών από πυρήνες ιστού όρχεως ενήλικου και νεαρού (17dpp) ποντικού με HCl. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε πως οι υπό μελέτη τροποποιήσεις διατηρούνται σε συνθήκες όξινης εκχύλισης. *Συντομογραφίες:* m: marker, T: total acid extracts from adult testes, εκχυλίσματα ολικών ιστονών από όρχεις ενήλικου ποντικού, t: total acid extracts from 17dpp mouse testes, εκχυλίσματα ολικών ιστονών από όρχεις νεαρού ποντικού (17dpp). Με βέλος σημειώνεται η θέση της ιστόνης H3.

Ως μέσο τεχνικού ελέγχου του πειραματικού σχεδιασμού, με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και της αναπαραγωγιμότητάς τους, κύτταρα που δε διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της Haspin (KO cells) αλλά και κύτταρα της πατρικής σειράς E14 υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία όξινης εκχύλισης ολικών ιστονών. Στην ανοσοαποτύπωση κατά Western συμπεριλήφθηκαν επιπλέον τα παρακάτω δείγματα: Α) ανασυνδυασμένη ιστόνη H3 (μη τροποποιημένη) και β) δείγμα της ίδιας ιστόνης, από το οποίο απουσίαζαν τα πρώτα 27 αμινοξέα (εικ. 73^A). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 73^B, τα κύτταρα που δεν διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της Haspin δεν φέρουν την τροποποίηση H3T3ph, παρόλο που η ιστόνη H3 βρίσκεται στο κλάσμα πρωτεϊνών που απομονώθηκαν (CBB core histones έναντι WB aP3). Ακόμη, είναι εμφανές ότι το aH3T3ph αντίσωμα αναγνωρίζει σε κάποιο βαθμό και τη μη τροποποιημένη ιστόνη H3 (WB aH3T3ph, E14 έναντι *rech3*). Αντίθετα, φαίνεται πως δεν αναγνωρίζει τη μη τροποποιημένη ιστόνη H3, από την οποία απουσιάζουν τα 27 πρώτα αμινοξέα (WB aH3T3ph, E14 έναντι *rech3* και *rech3t1s*).



Εικόνα 73. Εκχύλιση ολικών ιστονών από σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε πως στα Haspin KO κύτταρα, ενώ η ιστόνη H3 βρίσκεται στο απομονωθέν κλάσμα, η T3

δεν είναι φωσφορυλιωμένη. Ακόμη, το aH3T3rh αντίσωμα αναγνωρίζει και ένα ποσοστό της μη τροποποιημένης ιστόνης H3. Συντομογραφίες: m: marker, E14: πατρική κυτταρική σειρά, κύτταρα ελέγχου E14, Haspin KO: κλώνος που δε διαθέτει λειτουργικό γονίδιο της Haspin. Με βέλος σημειώνεται η θέση της ιστόνης H3, με * η ανασυνδυασμένη ιστόνη H3 (recH3) και με ** η ανασυνδυασμένη H3, από την οποία απουσιάζουν τα 27 πρώτα αμινοξέα. Οι σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων E14 και Haspin KO κατασκευάστηκαν από τους Δρ. Ελευθερία Καρανίκα και Δρ. Κατερίνα Σουψανά.

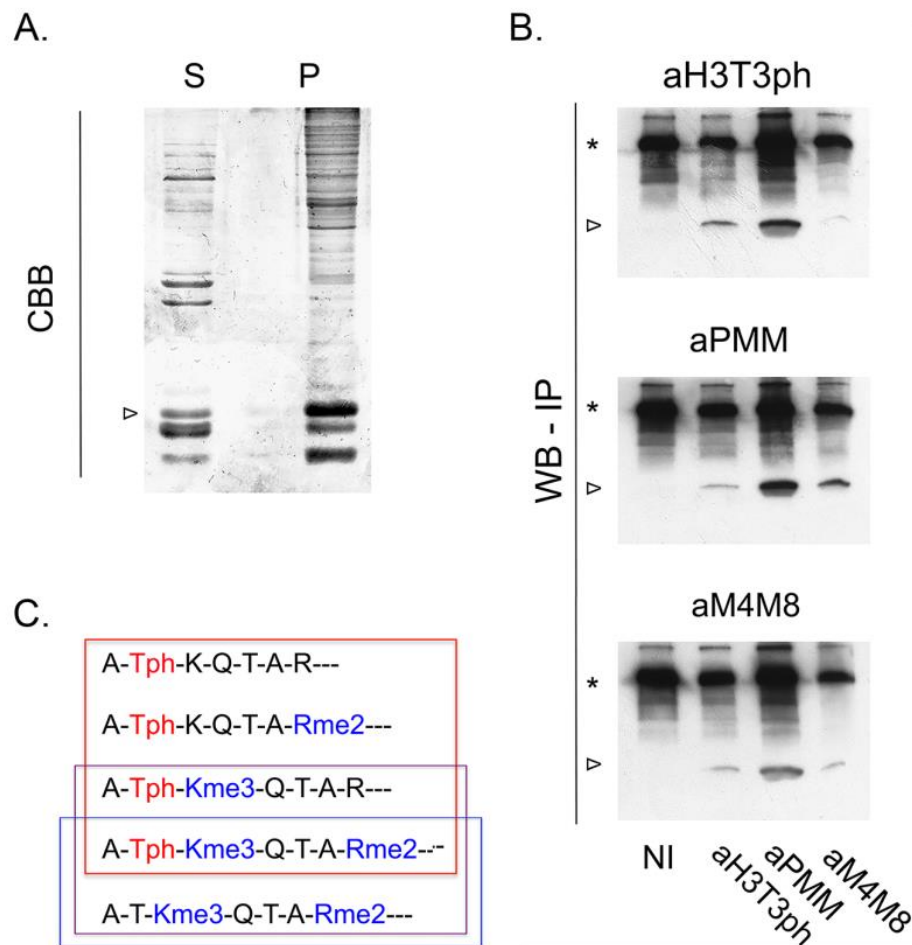
3.5.2. Τα κύτταρα του όρχεως είναι δυνατόν να φέρουν υποπληθυσμούς νουκλεοσωμάτων με εναλλαγές τροποποιήσεων φωσφορυλίωσης-μεθυλίωσης, στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3

Στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έγινε χρήση των ειδικών αντι-πεπτιδικών αντισωμάτων που έχουν παραχθεί στο εργαστήριό μας και αναγνωρίζουν τις παραπάνω τροποποιήσεις (H3T3rh, H3T3rhK4me₃R8me₂, H3K4me₃R8me₂). Σκοπός ήταν να αναγνωριστούν συνδυασμοί τροποποιήσεων στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3 από εκχυλίσματα ολικών ιστονών κυττάρων του όρχεως που έφεραν τα υπό μελέτη νουκλεοσώματα (εικ. 74^A). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή συμπερασμάτων έγινε σε συνδυασμό με τις δοκιμασίες ELISA και ανταγωνιστικής ELISA, για τον έλεγχο της ειδικότητας του aPMM αντισώματος με συνθετικά πεπτίδια που φαίνεται στην εικόνα 63.

Αρχικά, έγινε εκχύλιση ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ενήλικου ποντικού. Το τελικό προϊόν διαχωρίστηκε σε υπερκείμενο και ίζημα μέσω φυγοκέντρησης (εικ. 74^A, S έναντι P) και προετοιμάστηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.4.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 74^B (WB aH3T3rh), το aH3T3rh αντίσωμα αναγνωρίζει το προϊόν της ανοσοκατακρήμνισης με το aPMM και ασθενώς αυτό που προέρχεται από το aM4M8. Αντίστοιχα, το aPMM αντίσωμα (εικόνα 74^B, WB aPMM) αντέδρασε ισχυρά με τα προϊόντα της ανοσοκατακρήμνισης που προέρχονται από το aM4M8 αντίσωμα και ασθενέστερα με το κλάσμα που προερχόταν από το aH3T3rh αντίσωμα. Το aM4M8 αντίσωμα (εικόνα 74^B, WB aM4M8) αντέδρασε ισχυρά με τα προϊόντα της ανοσοκατακρήμνισης που προέρχονται από το aPMM αντίσωμα και λιγότερο με αυτό που προερχόταν από το aH3T3rh αντίσωμα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν έχουν διαφορετική ισχύ πρόσδεσης με τα υποστρώματα τους. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 74^B, ενώ τα αντισώματα είναι ισόποσα κατανεμημένα στα δείγματα (με * σημειώνονται οι βαριές αλυσίδες των αντισωμάτων), η ένταση του σήματος στην ανοσοαποτύπωση κατά Western διαφέρει. Ακόμη, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι τα αντισώματα αποτελούνται από μικτούς υποπληθυσμούς. Το aH3T3rh αντίσωμα π.χ. αναγνωρίζει και τη μη τροποποιημένη ιστόνη H3 (εικ. 73), ενώ το aPMM αναγνωρίζει ειδικά και την H3T3rhK4me₃R8 τροποποίηση (εικ. 63).



Εικόνα 74. Προσδιορισμός συνδυασμών τροποποιήσεων του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης H3 στα κύτταρα του όρχεως. **A.** Εκχύλιση ολικών ιστονών από ιστό όρχεως με τη χρήση οξέος και ανάλυση με SDS-PAGE (CBB). Με S σημειώνεται το υπερκείμενο που υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμνιση και με P το ίζημα. **B.** Δοκιμασίες ανοσοκατακρήμνισης (IP) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western (WB) με αντισώματα έναντι των H3T3ph, H3T3phK4me₃R8me₂ (aPMM) και H3K4me₃R8me₂ (aM4M8). Τα ίδια αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν και για την ανοσοαποτύπωση κατά Western. Με βέλος σημειώνεται η θέση της ιστόνης H3 και με αστερίσκο οι βαριές αλυσίδες των αντισωμάτων. Το NI αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα (pre-immune serum). **C.** Οι πιθανοί συνδυασμοί τροποποιήσεων του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης H3 και τα αντισώματα που τις αναγνωρίζουν. Το κόκκινο πλαίσιο αντιστοιχεί στο aH3T3ph, το μωβ στο aPMM και το κόκκινο στο aM4M8.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα προϊόντα της ανοσοκατακρήμνισης περιέχουν μικτούς πληθυσμούς πεπτιδίων. Αρχικά, επιβεβαιώνεται η παρουσία των τριών βασικών τροποποιήσεων, δηλαδή της H3T3ph, της H3T3phK4me₃R8me₂ και της H3K4me₃R8me₂. Επιπλέον, σε κάποιο βαθμό, στα δείγματα περιέχεται και μη-τροποποιημένη ιστόνη H3 (H3T3K4R8), όπως επίσης και H3T3phK4me₃R8. Το γεγονός ότι το aM4M8 αναγνωρίζει το προϊόν της ανοσοκατακρήμνισης με το aP3 αντίσωμα, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει σε πολύ μικρό βαθμό υποδηλώνει ότι τα πεπτίδια που φέρουν τις μεθυλιώσεις, είναι δυνατόν να έχουν φωσφορυλιωμένα και την T3. Αντίθετα, τα πεπτίδια που φέρουν την H3T3ph

είναι δυνατόν να έχουν ταυτόχρονα: α) και τις δυο μεθυλιώσεις ($H3T3rhK4me_3R8me_2$ -μοτίβο PMM), β) μεθυλιωμένη την K4 ($H3T3rhK4me_3R8$ -αναγνωρίζεται από το aPMM) και γ) με μικρότερη πιθανότητα τον συνδυασμό $H3T3rhK4R8me_2$. Οι πιθανοί συνδυασμοί τροποποιήσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 74^c. Για την εξακρίβωση της υπόθεσης αυτής, εκχυλίσματα ολικών ιστονών από ιστό όρχεως ενήλικου ποντικού θα υποβληθούν σε ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας, στις εγκαταστάσεις συνεργαζόμενου εργαστηρίου.

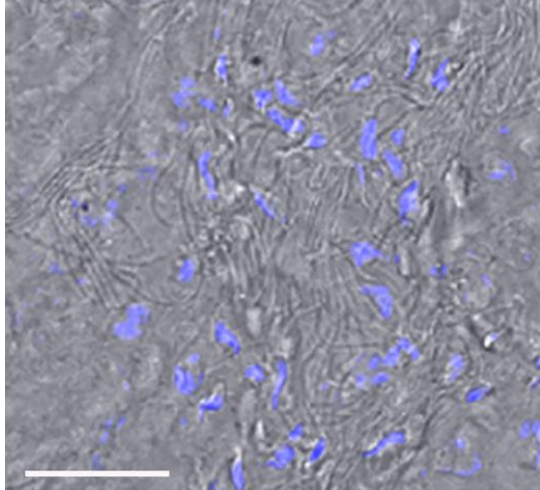
4. Συζήτηση

4.1 Η ταυτοποίηση των σταδίων ανάπτυξης του επιθηλίου του όρχεως με τη χρήση τομών κρουστάτη

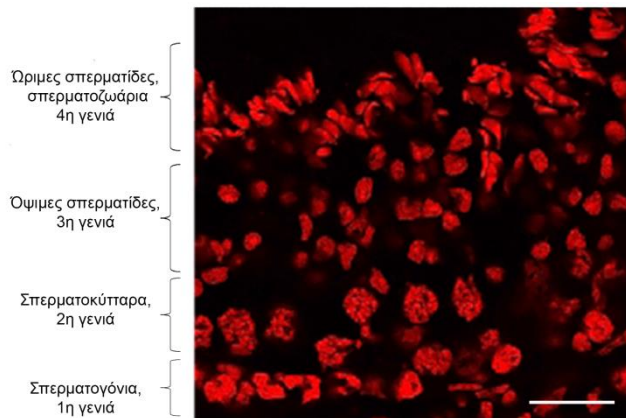
Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός μελετών για τον καθορισμό των σταδίων του κύκλου του σπερματοφόρου επιθηλίου σε τομές κρουστάτη. Η κατηγοριοποίηση στις τέσσερις γενικές ομάδες που παρουσιάστηκαν έγινε λαμβάνοντας υπόψη 1) μορφολογικές παρατηρήσεις σε συνεστιακό μικροσκόπιο, 2) τεχνικούς περιορισμούς της μεθοδολογίας που υιοθετήθηκε και 3) την πορεία της διαφοροποίησης βάσει της βιβλιογραφίας.

Η σπερματογένεση στο ενήλικο ποντίκι είναι μια συνεχής διαδικασία. Τα σπερματογόνια διαιρούνται μιτωτικά και διαφοροποιούνται ώστε να προκύψουν τα (προλεπτοταινικά) σπερματοκύτταρα. Αυτά με την σειρά τους διέρχονται από μία εκτεταμένη χρονικά πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης για να καταλήξουν ως πρωτογενή και δευτερογενή σπερματοκύτταρα αντίστοιχα, μετά το τέλος των δύο μειωτικών διαιρέσεων. Από το σημείο αυτό και έπειτα, οι πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες (βήματα 1-7) ωριμάζουν σταδιακά, διαμέσου της διαδικασίας που αποκαλείται σπερμιογένεση, σε ώριμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες (βήματα 8-10). Η καταληκτική φάση της πορείας αυτής δίνει τις ώριμες επιμηκυνόμενες σπερματίδες (βήματα 11-16) και τελικά τα σπερματοζωάρια που απελευθερώνονται στον αυλό των σωληναρίων. Συνεπώς, η πορεία της διαφοροποίησης του σπέρματος είναι φαινομενικά κυκλική. Εντός του πλαισίου των σπερματοφόρων σωληναρίων τα διαφοροποιούμενα κύτταρα μετακινούνται από τη βασική μεμβράνη (εξώτερο τμήμα) προς τον αυλό. Επιπλέον, καινούρια κύτταρα εισέρχονται στην πορεία της διαφοροποίησης συγχρονισμένα χρονικά, σε καθορισμένες θέσεις (κοντά στη βασική μεμβράνη των σωληναρίων). Με τον τρόπο αυτό, οι ίδιοι τύποι κυττάρων βρίσκονται σε διαφορετικούς μεταξύ τους συσχετισμούς, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του επιθηλίου⁽¹⁶³⁾.

Τέσσερις γενιές κυττάρων διαφοροποιούνται διαδοχικά, η μια κάτω από την άλλη και εποικίζουν το επιθήλιο. Η απελευθέρωση του ώριμου σπέρματος (4^η γενιά, εικ. 75) στον αυλό των σωληναρίων, κατά το στάδιο VIII, αποτελεί σήμα για την ολοκλήρωση της πορείας της σπερμιογένεσης για την προηγούμενη γενιά (πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες βήματος 7, 3^η γενιά), με τη μετάβαση από τις κανονικές ισομορφές των ιστονών στις νούκλεο-πρωταμίνες. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τα σπερματοκύτταρα (2^η γενιά) θα οδηγηθούν στο τέλος των μειωτικών διαιρέσεων, ώστε να προκύψει η επόμενη γενιά απλοειδών σπερματίδων και τα σπερματογόνια (1^η γενιά) θα εισέλθουν στη φάση της προλεπτοταινίας (προ-μειωτικό στάδιο). Στην εικόνα 76 απεικονίζονται οι συσχετισμοί αυτών των κυτταρικών τύπων στο επιθήλιο του όρχεως.



Εικόνα 75. Ωριμα σπερματοζωάρια ενήλικου ποντικίου με πλήρως σχηματισμένη ουρά. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο. Η χρώση πυρήνα-κεφαλής έγινε με TO-PRO 3. Η ουρά απεικονίζεται στο DIC. Scale bar 20μm.



Εικόνα 76. Οι σχετικές θέσεις των τεσσάρων γενεών-κυτταρικών σειρών στο επιθήλιο του όρχεως. Τα αδιαφοροποίητα σπερματογόνια εντοπίζονται κοντά στη βασική μεμβράνη του σωληναρίου (κάτω), ενώ τα ώριμα σπερματοζωάρια κοντά στον αυλό (πάνω). Η χρώση του DNA έγινε με Propidium Iodide. Scale bar 20μm.

Συγκριτικό πλεονέκτημα της χρήσης τομών παραφίνης, π.χ. με χρώση PAS, αιματοξυλίνης κτλ. είναι η δυνατότητα παρατήρησης της μορφολογίας του ακροσωμικού κυστιδίου στις απλοειδείς σπερματίδες και η χρήση του για τον προσδιορισμό του αναπτυξιακού σταδίου. Η μέθοδος αυτή παρέχει επιπλέον τη βέλτιστη διατήρηση της μορφολογίας του ιστού, όπως επίσης και τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ ορισμένων τύπων σπερματογονίων. Παρόλα αυτά προκύπτουν εγγενείς περιορισμοί, όπως είναι η αδυναμία ανοσοϊστοχημικής χρώσης, σε συνδυασμό με τη μέθοδο PAS ή η δυσχέρεια στην ταυτοποίηση σταδίων σε περιπτώσεις απουσίας κυτταρικών τύπων. Κάτι τέτοιο συμβαίνει π.χ. σε νεαρά ή γενετικά τροποποιημένα ποντίκια⁽¹⁶²⁾. Αντίθετα, οι τομές κρουστάτη, ενώ είναι λιγότερο σταθερές, διατηρούν καλύτερα τους επιτόπους και επομένως διευκολύνουν την εφαρμογή μεθόδων ανίχνευσης με ανοσοϊστοχημεία και τη χρήση μικροσκοπίας. Επιπλέον, περιορίζεται ο χρόνος προετοιμασίας των παρασκευασμάτων και τα ενδιάμεσα βήματα που απαιτούνται για την οπτικοποίησή τους. Τέλος, η ταχεία ψύξη με τη χρήση υγρού αζώτου περιορίζει τη δημιουργία κρυστάλλων εντός των ιστών και βελτιώνει την μορφολογία τους⁽²²⁶⁾.

4.2 Η παρουσία της Haspin στη σπερματογένεση

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν μέχρι τώρα αναδεικνύουν την πολύπλευρη λειτουργία της Haspin στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και τους αρσενικούς γαμέτες. Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε ο ρόλος της μιτωτικής αυτής κινάσης με τεχνικές έμμεσου ανοσοφθορισμού, ανταγωνιστικής αναστολής, συνεστιακής μικροσκοπίας και ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Η απουσία λειτουργικού αντισώματος έναντι της Haspin οδήγησε στον έμμεσο έλεγχο της παρουσίας της, διαμέσου της φωσφορυλίωσης που αυτή καταλύει. Από τη στιγμή που η H3T3rh αποτελεί τμήμα της τριπλής τροποποίησης PMM (H3T3rhK4me₃R8me₂), μελετήθηκε παράλληλα και η κατανομή του μοτίβου αυτού στους ίδιους κυτταρικούς τύπους.

Αρχικά, ταυτοποιήθηκε η παρουσία της H3T3rh σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια, τόσο κατά το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης, όσο και στους ενήλικους πληθυσμούς. Η τροποποίηση αυτή δεν ανιχνεύτηκε σε μειωτικά σπερματοκύτταρα κατά την πρόφαση I ή κατά τη διακίνηση της μειωτικής διαίρεσης, αλλά σε κυτταρικούς πληθυσμούς από τη μετάφαση I έως και το τέλος της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Μετά από ένα διάστημα απουσίας κατά τον κύκλο ωρίμανσης του επιθηλίου του όρχεως, εντοπίστηκε σε περιοχές «χαλαρής» χρωματίνης απλοειδών σπερματίδων βήματος 8-10, πριν την έναρξη της υπερ-συμπύκνωσης του γενετικού υλικού στην κεφαλή του ώριμου σπέρματος. Ταυτόχρονα με τα παραπάνω, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του μοτίβου PMM σε μιτωτικά και μειωτικά διαιρούμενα κύτταρα, όπως επίσης και σε μετα-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες βήματος 5-10. Παρόλα αυτά είναι πιθανό η Haspin να φωσφορυλιώνει οποιαδήποτε από τις ισομορφές H3.1, H3.3 ή H3t της ιστόνης H3, αφού η αλληλουχία τους είναι ταυτόσημη στα 24 πρώτα αμινοξέα. Επιπλέον, οι ισομορφές αυτές εκφράζονται στο χρονικό διάστημα που ανιχνεύτηκε η H3T3rh (βλέπε εικ. 5).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση της Haspin υπόκειται σε χρονικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Σύμφωνα με τα στάδια που μελετήθηκαν είναι παρούσα σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια. Μετά από ένα διάστημα απουσίας, κατά την πρόφαση I, ενεργοποιείται σε μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα και η λειτουργία της καταστέλλεται ξανά, μετά την ολοκλήρωση των διαιρέσεων. Στις πρώιμες απλοειδείς σπερματίδες βήματος 1-7 δεν εκφράζεται. Ωστόσο, η παρουσία της H3T3rh σε όψιμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες απλοειδείς σπερματίδες βήματος 8-10 δείχνει ότι ενεργοποιείται ξανά για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα σε κάποια στάδια της σπερμιογένεσης.

Η ρύθμιση της έκφρασης της Haspin είναι δυνατόν να ασκείται σε μεταγραφικό, μεταφραστικό ή σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ο προοδευτικός εκφυλισμός του μεταγραφικού μηχανισμού κάνει πιο ελκυστική την πιθανότητα ελέγχου στο πρωτεϊνικό επίπεδο κατά τη

σπερμιογένεση. Οι απλοειδείς σπερματίδες αποθηκεύουν mRNA και πρωτεΐνες με σκοπό να τις χρησιμοποιήσουν είτε στα τελευταία στάδια της σπερμιογένεσης, είτε μετά τη γονιμοποίηση. Επιπρόσθετα, οι απλοειδείς σπερματίδες, οι οποίες προέρχονται από το ίδιο πατρικό κύτταρο, συνδέονται μεταξύ τους μέσω κυτταροπλασματικών γεφυρών (ring canals). Μέσω αυτών ανταλλάσσουν mRNA, σηματοδοτικά μόρια και οργανίδια (π.χ. chromatoid body)^(227, 228). Ένα επιπλέον στοιχείο είναι το γεγονός ότι η φωσφατάση PP1γ που είναι υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση της Haspin στα σωματικά κύτταρα εκφράζεται στα σπερματογόνια με την ισομορφή PP1γ1 και στα μειωτικά σπερματοκύτταρα και τις απλοειδείς σπερματίδες με την ειδική για τον όρχι ισομορφή PP1γ2⁽²²⁹⁻²³¹⁾. Επομένως, είναι λογική υπόθεση ότι ίσως να ρυθμίζει και την ενεργοποίηση/απενεργοποίηση της υπό μελέτη κινάσης, μέσω αυτών των ισομορφών. Τα δεδομένα αυτά όμως δεν αποκλείουν τη ρύθμιση στο επίπεδο της μεταγραφής, αφού σε όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης παρατηρούνται στάδιο-ειδικές μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους⁽²³²⁻²³⁴⁾. Μία ακόμη πιθανή εξήγηση είναι ότι ενώ εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης, το καταλυτικό της κέντρο παραμένει ανενεργό, μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης (HBIS, φωσφορυλίωση από την Plk1, την CDK1 κτλ.), στα χρονικά διαστήματα όπου η λειτουργία της δεν είναι απαραίτητη. Η παρουσία της σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια και η απουσία της από μεσοφασικά συμφωνεί με ό,τι έχει περιγραφεί για τα σωματικά κύτταρα. Ακόμη, με τον τρόπο αυτό μπορεί να εξηγηθεί η απουσία της H3T3ph στο διάστημα από την πρόφαση I έως τη διακίνηση, αφού η προστασία της συνοχής διαμεσολαβείται από το αμινο-τελικό της άκρο και όχι από το καταλυτικό καρβοξυ-τελικό της τμήμα.

4.2.1. Τα μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια

Η H3T3ph απουσίαζε από τα διαφοροποιημένα και τα αδιαφοροποίητα μεσοφασικά σπερματογόνια. Αντίθετα, κατά τη μιτωτική διαίρεση των κυττάρων αυτών τόσο η H3T3ph, όσο και το μοτίβο PMM μπορούσαν να ανιχνευθούν με ακρίβεια. Η κατανομή της παρουσίασε πρότυπο όμοιο με αυτό που έχει περιγραφεί για τα σωματικά κύτταρα^(88, 93). Όπως φαίνεται και στις εικόνες 43-44, καταλάμβανε το σύνολο του χρωμοσωμικού βραχίονα στα πρώτα στάδια της μίτωσης και τις περικεντρομεριδιακές περιοχές στα επόμενα, χωρίς όμως να απουσιάζει εντελώς από τους βραχίονες.

Ομοίως τόσο η INCENP, όσο και η Aurora B βρίσκονται στα κεντρομερίδια και τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων κατά την πρόφαση της μιτωτικής διαίρεσης των σπερματογονίων. Στη μετάφαση ανιχνεύονται στα κεντρομερίδια, με ένα υπολειπόμενο ποσοστό να βρίσκεται και στους βραχίονες των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων. Κατά

την ανάφαση και την τελόφαση οι δύο υπομονάδες του CPC βρίσκονται στη ζώνη αποκοπής και στο μεσόσωμα αντίστοιχα⁽¹⁸⁶⁾. Η Survivin, αν και στο ποντίκι εκφράζεται κυρίως σε μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα, ανιχνεύεται στον αρουραίο σε μικρότερο ποσοστό και σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια^(188, 189). Ακόμη, η topoisomerase IIa εντοπίζεται στα κεντρομερίδια σπερματογόνιων κατά την G2/M⁽¹⁸⁴⁾. Λαμβάνοντας υπόψη το πρότυπο κατανομής της φωσφορυλίωσης που καταλύεται από την Haspin, είναι πιθανό η υπό μελέτη κινάση να εκφράζεται μόνο κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης των σπερματογόνιων και όχι κατά τη μεσόφαση, όπως συμβαίνει δηλαδή και στα σωματικά κύτταρα. Συνυπολογίζοντας τη θέση των υπομονάδων του CPC, της topoisomerase IIa αλλά και της φωσφατάσης PP1γ φαίνεται πως η δράση της Haspin στα σπερματογόνια είναι όμοια με αυτήν που παρουσιάζει στη μίτωση των σωματικών κυττάρων. Συνεπώς, η Haspin στα προ-μειωτικά σπερματογόνια πιθανόν να ρυθμίζει την προσέλευση του CPC στα κεντρομερίδια και την προστασία των αδελφών χρωματίδων από πρόωρη απελευθέρωση μέσω της φωσφορυλιωμένης θρεονίνης 3 της ιστόνης H3.

4.2.2. Τα μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα

Αμέσως μετά τη στοιβάδα των σπερματογόνιων, στο εσωτερικό των σπερματοφόρων σωληναρίων βρίσκονται τα σπερματοκύτταρα που διανύουν τη μειωτική φάση (εικόνα 73). Όπως φαίνεται και στις εικόνες 35^A και 36^A, τα σπερματοκύτταρα που διανύουν την πρόφαση I ανιχνεύονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του επιθηλίου, ενώ οι φάσεις από τη μετάφαση I έως και την ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης λαμβάνουν χώρα στο στάδιο XII.

Τα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η H3T3rh, απουσίαζε από τα σπερματοκύτταρα κατά την πρόφαση I. Ωστόσο, μια πιο ενδελεχής μελέτη σε σωληνάρια σταδίου XII αποκάλυψε πως η H3T3rh ανιχνεύεται σε σπερματοκύτταρα που βρίσκονται από τη μετάφαση I έως τη μετάφαση/ανάφαση II. Η H3T3rh δεν ανιχνεύτηκε επίσης κατά το στάδιο της διακίνησης. Κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση βρέθηκε στις περικεντρομεριδικές περιοχές, αλλά και σε όλο το μήκος των βραχιόνων των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Το πρότυπο αυτό φαίνεται να περιορίζεται προοδευτικά από την ανάφαση I έως την τελόφαση I. Μεταξύ των δύο μειωτικών διαιρέσεων, αλλά και κατά τη δεύτερη διαίρεση, ανιχνεύτηκε μόνο στις περικεντρομεριδικές περιοχές. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα για το μοτίβο PMM. Το πρότυπο κατανομής της H3T3rh στη μείωση (εικ. 52) είναι όμοιο με αυτό που έχει περιγραφεί για ορισμένα φυτικά κύτταρα (*Secale cereal*, Caperta et al., 2008²³⁵).

Η RNA πολυμεράση II μεταγράφει περιοχές της περικεντρομεριδιακής ετεροχρωματίνης (repetitive elements), με τη βοήθεια του DICER (RNAi mediated silencing pathway) από το στάδιο της διπλοταινίας (πρόφαση I) έως την πρώτη μειωτική διαίρεση, όχι όμως και στη δεύτερη⁽²⁰¹⁾. Ταυτόχρονα, κατά την έναρξη της μιτωτικής διαίρεσης η H3T3rh προκαλεί παύση της μεταγραφικής δραστηριότητας διαμέσου της αποσύνδεσης των παραγόντων TFIID και TAF3 από την παρακείμενη τρι-μεθυλιωμένη λυσίνη 4⁽²³⁶⁾.

Η topoisomerase IIa ρυθμίζει τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και τη λύση των χιασμάτων κατά τη μειωτική διαίρεση. Εντοπίζεται κοντά στα κεντρομερίδια από το στάδιο της παχυταινίας έως το τέλος της μείωσης ενώ απουσιάζει από τις μετα-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες⁽¹⁸⁴⁾. Παράλληλα με την topoisomerase IIa και οι υπομονάδες του CPC εντοπίζονται σταδιακά στη συμπυκνωμένη χρωματίνη από το μέσο της πρόφασης I μέχρι το τέλος της μείωσης έως και τα πρώτα βήματα των απλοειδών σπερματίδων^(186, 190). Ακόμη, οι υπομονάδες smc1b και smc3 του συμπλόκου της cohesin ανιχνεύονται στα κεντρομερίδια από τη μετάφαση I και έπειτα⁽¹⁹⁴⁾. Η Rec8 απομακρύνεται από τους χρωμοσωμικούς βραχίονες κατά τη μετάφαση/ανάφαση I, αλλά προστατεύεται στα κεντρομερίδια έως και τη μετάφαση/ανάφαση II⁽¹⁸⁵⁾. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η Haspin είναι υπεύθυνη για μία ακόμη τροποποίηση, την tH2AT127ph, η οποία εντοπίζεται στα κεντρομερίδια ωκυττάρων κατά τη μετάφαση I και σε συμπυκνωμένες απλοειδείς σπερματίδες^(89, 237).

Τα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι η Haspin εκφράζεται στα σπερματοκύτταρα κατά τη διάρκεια της μείωσης και ενεργοποιείται μετά τη διακίνηση, αφού ολοκληρωθεί η συγκρότηση του CPC στα κεντρομερίδια. Σε αντίθεση λοιπόν με ό,τι συμβαίνει στα σωματικά κύτταρα, η Haspin ίσως να μην είναι υπεύθυνη για τη συγκρότηση του CPC στα κεντρομερίδια των μειωτικών κυττάρων. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με πρόσφατα δημοσιευμένα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα οποία δείχνουν ότι η Borealin και όχι η Survivin είναι υπεύθυνη για την επιστράτευση του CPC στα σκέλη των χρωμοσωμάτων μιτωτικών κυττάρων και ότι το γεγονός αυτό είναι προαπαιτούμενο για την ενεργοποίηση της Haspin και της Bub1 στα κεντρομερίδια⁽²³⁸⁾. Η απουσία της H3T3rh από την ύστερη πρόφαση I-διακίνηση διευκολύνει επίσης την ολοκλήρωση της μεταγραφής των περικεντρομεριδιακών περιοχών. Επιπλέον, είναι πιθανό ότι η Haspin, διαμέσου της H3T3rh, ρυθμίζει τη συνοχή των ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση και προστατεύει τις αδελφές χρωματίδες από πρόωρη απελευθέρωση κατά τη δεύτερη, σε συνεργασία με τη Rec8.

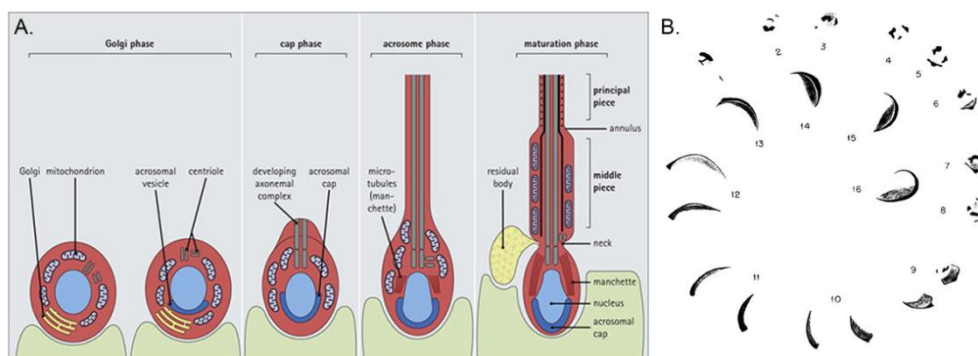
4.2.3. Οι μετα-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες

Η φωσφορυλίωση που καταλύεται από τη Haspin βρέθηκε να εντοπίζεται ευχρωματινικές περιοχές όψιμων στρογγυλών και επιμηκυνόμενων απλοειδών σπερματίδων βήματος 8-11, ενώ το μοτίβο PMM ταυτοποιήθηκε επιπλέον και σε πολύ πρώιμες απλοειδείς σπερματίδες βήματος 4-7 (εικ. 55 και 58). Η παρουσία της HP1α στις πρώιμες απλοειδείς σπερματίδες (εικ. 65) ίσως να αποτελεί τη βάση για την προσέλκυση της Haspin σε αυτές τις περικεντρομεριδιακές περιοχές, εφόσον οι δύο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των μοτίβων CSD και PxVxL, αντίστοιχα (εικ. 29). Άρα, είναι λογικό η H3T3rh να εξαπλώνεται στις ευχρωματινικές περιοχές των απλοειδών σπερματίδων από το σημείο αυτό και έπειτα.

Οι δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής επιβεβαίωσαν την ειδικότητα των αντισωμάτων. Μάλιστα η αναστολή του aH3T3rh αντισώματος, από το αντίστοιχο πεπτιδίο (H3T3rhK4me₃R8me₂) βρέθηκε να είναι όσο-εξαρτώμενη (εικ. 57). Επιπρόσθετα, το παράδοξο της παρουσίας της PMM υπογραφής σε σπερματοφόρα σωληνάκια όπου δεν ανιχνεύτηκε η H3T3rh (στάδιο V-VIII, εικ. 58) βρέθηκε να οφείλεται στην αναγνώριση των δυο μεθυλίσεων (H3K4me₃R8me₂) και όχι της φωσφορυλίωσης από ένα υποπληθυσμό του aPMM αντισώματος.

Το χρονικό πλαίσιο ανίχνευσης των παραπάνω τροποποιήσεων συμπίπτει με διακριτές φάσεις της σπερμιογένεσης. Η παρουσία των δύο μεθυλίσεων (H3K4me₃R8me₂) σε απλοειδείς σπερματίδες βήματος 5-7 ταυτίζεται με την έναρξη της φάσης της καλύπτρας (cap phase). Στο σημείο αυτό ξεκινά η επιμήκυνση της σπερματίδας, το ακρόσωμα αναπτύσσεται κεφαλικά καλύπτοντας τα 2/3 του διαθέσιμου χώρου και το μαστίγιο μεγαλώνει⁽¹⁵⁹⁾ (εικ. 77). Ταυτόχρονα, εκφράζονται γονίδια που σχετίζονται με τη συγκρότηση του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης, την κινητικότητα του σπέρματος, την ανάπτυξη του κυτταροσκελετού ακτίνης, την ορμονική ρύθμιση κ.α.⁽²³⁴⁾

Η παρουσία της H3T3rh και του μοτίβου PMM σε απλοειδείς σπερματίδες βήματος 8-10 συμπίπτει με την ακροσωμική φάση (acrosomal phase) της σπερμιογένεσης (εικ. 77). Στη φάση αυτή, οι σπερματίδες προσανατολίζονται, ώστε να αντικρίζουν τον αυλό του σωληναρίου, ο πυρήνας επιμηκύνεται και ξεκινά η πλευρική συμπίεσή του. Επιπλέον, η ραχιαία πλευρά αποκτά το χαρακτηριστικό γωνιώδες σχήμα της. Ακόμη, τα μιτοχόνδρια μετακινούνται στον αυχένα, η περίσσεια του κυτταροπλάσματος μετατοπίζεται στο ουραίο άκρο, το μαστίγιο ωριμάζει, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και διακόπτεται ένα μεγάλο μέρος της γονιδιακής έκφρασης^(159, 239). Τα εναπομείναντα γονίδια που εκφράζονται σχετίζονται με την κινητικότητα του σπέρματος, το μονοπάτι της γλυκόλυσης και ορισμένες ειδικές σηματοδοτικές οδούς (π.χ. PI3K-Akt, Protein kinase A signaling)⁽²³⁴⁾.



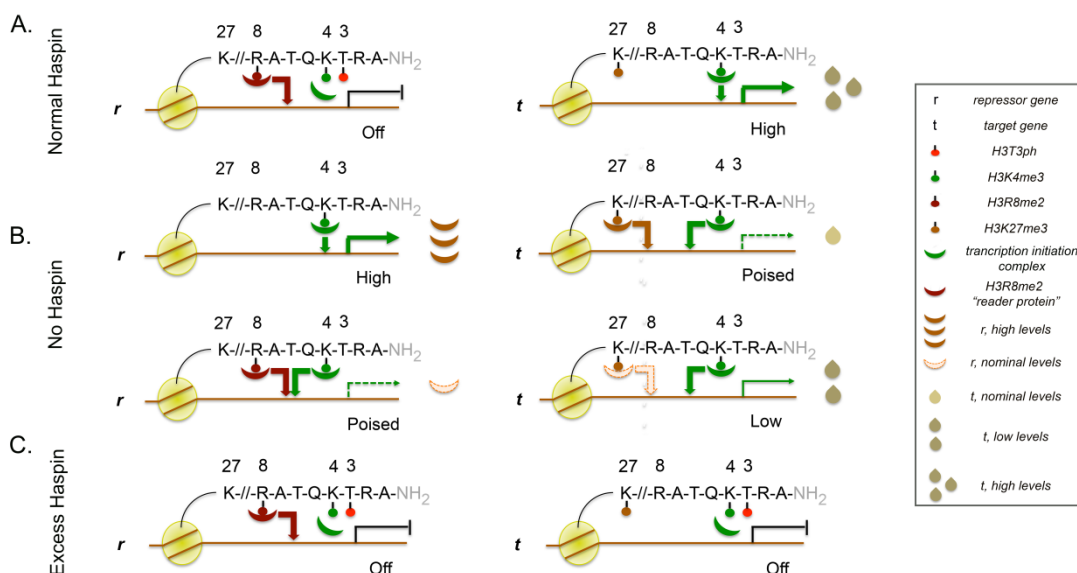
Εικόνα 77. Σχηματική αναπαράσταση της σπερμιογένεσης. **A.** Γραφική απεικόνιση των φάσεων της σπερμιογένεσης και των μεταξύ τους διαφορών. Εικόνα τροποποιημένη από <https://basicmedicalkey.com/male-reproductive-system-7/>. **B.** Τα 16 βήματα ανάπτυξης των απλοειδών σπερματίδων σύμφωνα με τον Oakberg EF, 1956¹⁵⁹.

4.3 Η σημασία της κατανομής των τροποποιήσεων του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης H3 σε ευχρωματινικές και ετεροχρωματινικές περιοχές των απλοειδών σπερματίδων

Μεταξύ των βημάτων 1 και 8 οι στρογγυλές σπερματίδες διατηρούν ένα ιδιαίτερος ενεργό μεταγραφικό μηχανισμό, ο οποίος απενεργοποιείται σταδιακά κατά την επιμήκυνσή τους στα βήματα 9 έως 11⁽¹⁷⁾. Μεταγραφικοί παράγοντες, όπως είναι ο TBP (TATA binding protein), ο TFIIIB και η RNA πολυμεράση II, εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα σπερματοκύτταρα αυτής της κατηγορίας⁽²⁴⁰⁾. Ταυτόχρονα, μέλη των συμπλόκων PRC1 (polycomb repressive complex 1) και PRC2 (polycomb repressive complex 2) ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση σε ολόκληρη τη σπερματογένεση, με την εγκατάσταση αμφίσημων τροποποιήσεων στη χρωματίνη (bivalent chromatin domains)^(215, 241). Επιπρόσθετα, η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης της ιστόνης H3 έχει συνδεθεί με το μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης⁽²⁴²⁻²⁴⁵⁾.

Στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε ότι η εγκατάσταση των τροποποιήσεων μεθυλίωσης προηγείται της εγκατάστασης της φωσφορυλίωσης που ολοκληρώνει την PMM-υπογραφή στις απλοειδείς σπερματίδες. Ταυτόχρονα, προϊόντα ειδικών για τη σπερματογένεση γονιδίων, όπως είναι το Scml2 και το Dazl, τα οποία επηρεάζονται από μεταβολές της έκφρασης της Haspin σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού, βρέθηκαν να συνυπάρχουν με την H3T3rh στις ευχρωματινικές περιοχές όψιμων στρογγυλών και επιμηκυνόμενων σπερματίδων βήματος 8 έως 10. Κατ' αναλογία με τα ήδη δημοσιευμένα δεδομένα για τον έλεγχο της μεταγραφής από την H3T3rh⁽²³⁶⁾ και σύμφωνα με όσα παρουσιάστηκαν παραπάνω είναι πιθανό ότι η Haspin, μέσω της

φωσφορυλίωσης της θρεονίνης 3 της ιστόνης H3 (H3T3ph), και σε συνδυασμό με την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 4 (H3K4me₃) και τη διμεθυλιωμένη αργινίνη 8 (H3R8me₂) να λειτουργεί ως ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων στόχων της σπερματογένεσης, όσο και των καταστολέων/ενεργοποιητών τους στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και τις απλοειδείς σπερματίδες (εικ. 78).



Εικόνα 78. Προτεινόμενος μηχανισμός για το μεταγραφικό έλεγχο που πιθανώς να ασκείται από τη Haspin. Ο μηχανισμός αυτός αφορά γονίδια-τελεστές *r* (κατασταλτικά) και γονίδια στόχους *t*. **(A)** Όταν τα επίπεδα της Haspin είναι φυσιολογικά (π.χ. στάδιο VIII-X), η θρεονίνη 3 φωσφορυλιώνεται στη θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS) και η μεταγραφή σταματά για το γονίδιο-τελεστή *r*. Στο γονίδιο-στόχο *t* η T3 δεν φωσφορυλιώνεται, αλλά η ύπαρξη της H3K4me₃ οδηγεί σε αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα (πάνω σειρά). **(B)** Όταν δεν υπάρχει λειτουργικό γονίδιο της Haspin (π.χ. Haspin KO κύτταρα ή στάδια I-IV και V-VIII), η H3T3 δεν είναι φωσφορυλιωμένη ούτε στο *r*, ούτε στο *t*. Στην περίπτωση που υπάρχει μόνο η H3K4me₃, το γονίδιο *r* μεταγράφεται σε υψηλά επίπεδα (No Haspin, αριστερά) και άρα η μεταγραφή του *t* παρεμποδίζεται (No Haspin, δεξιά). Στην περίπτωση που υφίστανται και οι δύο τροποποιήσεις μεθυλίωσης H3K4me₃-H3R8me₂ (No Haspin, κάτω αριστερά), το γονίδιο *t* μεταγράφεται ελάχιστα, καθώς ο τελεστής *r* αναγνωρίζει και συνδέεται στο TSS του (No Haspin, κάτω δεξιά). **(C)** Στην περίπτωση που η Haspin υπερεκφράζεται (π.χ. Haspin OE κύτταρα), η θρεονίνη 3 είναι φωσφορυλιωμένη σε όλες τις θέσεις. Συνεπώς, ακόμα και όταν η H3R8 είναι διμεθυλιωμένη στον τελεστή *r*, αυτός δεν μεταγράφεται. Αντίστοιχα, στο γονίδιο-στόχο *t* η μεταγραφική δραστηριότητα παύει λόγω παρεμπόδισης από την H3T3ph (Excess Haspin).

Η παρουσία αμφίσημων τροποποιήσεων στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3 και ο ρόλος τους στη διατήρηση μιας μεταγραφικά ενδιάμεσης κατάστασης (poised state) στους υποκινητές γονιδίων που αυτές βρίσκονται είναι καλά τεκμηριωμένη στη βιβλιογραφία⁽²⁴⁶⁻²⁴⁸⁾. Η εναλλαγή της κατανομής ρυθμιστικών πρωτεϊνών, αλλά και τροποποιήσεων μεθυλίωσης (π.χ. H3K9me₃) και φωσφορυλίωσης (π.χ. H3S10ph) του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης H3, στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα πρώιμων και όψιμων απλοειδών σπερματίδων ενισχύει την παραπάνω άποψη.

Μια πρώτη εξήγηση για την παρουσία των H3K9me₃/H3S10ph στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα είναι η απενεργοποίηση γονιδίων μέσω της δημιουργίας ετεροχρωματίνης. Η ομάδα της Kunowska το 2015⁽²⁴⁹⁾ ταυτοποίησε ένα σύμπλοκο με κέντρο την Atrx που συμπεριλαμβάνει τις Tif1α, Tif1γ, Fact140, Ssrp1 και Daxx, το οποίο αναγνωρίζει τις H3K9me₃ και H3S10ph και προσδένεται σε αυτές. Η Atrx συνδέεται με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης, είναι απαραίτητη για τη χρωμοσωμική σταθερότητα (chromosome stability) σε ωκύτταρα και έμβρυα ποντικού, ενώ σε συνεργασία με την Daxx είναι υπεύθυνες για την απόθεση της H3.3 στα κεντρομερίδια και τα τελομερή⁽²⁵⁰⁻²⁵²⁾.

Μια επιπλέον πιθανή εξήγηση για τη μεταβολή που παρατηρήθηκε στα συμπυκνωμένα χρωμοκέντρα, με την HP1α να τα καταλαμβάνει στις πρώιμες στρόγγυλες σπερματίδες και την H3S10ph στις όψιμες στρόγγυλες και επιμηκνόμενες σπερματίδες είναι η αποφυγή δημιουργίας συστατικής ετεροχρωματίνης (constitutive heterochromatin-cHC). Τόσο τα σπερματοζώαρια, όσο και το ζυγωτό του ποντικού δεν φέρουν τυπική cHC. Αντίθετα, βασίζονται στα σύμπλοκα PRC1 και PRC2 για τη δημιουργία περιστασιακής ετεροχρωματίνης (facultative heterochromatin-fHC). Αυτή αντικαθίσταται από τις H3K9me₃/HP1 στο στάδιο των 8 κυττάρων (8-cell stage), όπου υιοθετείται ξανά η cHC⁽²⁵³⁾.

Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν προηγούμενες παρατηρήσεις, ότι δηλαδή στις απλοειδείς σπερματίδες οι τροποποιήσεις μεθυλίωσης εγκαθιδρύνονται νωρίτερα από αυτές της φωσφορυλίωσης και ενισχύουν την άποψη ότι η H3T3ph συμμετέχει στον επιγενετικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα όπου εντοπίζεται. Ταυτόχρονα αποκαλύπτουν την εναλλαγή μεταξύ μηχανισμών ελέγχου της περικεντρομεριδιακής ετεροχρωματίνης κατά την πρόοδο της συμπύκνωσης του πυρήνα των σπερματίδων, παράλληλα με τη μετάβαση από τις ιστόνες στις μεταβατικές πρωτεΐνες (TNP1, TNP2).

4.3.1. Ο ρόλος των H3T3ph και PMM στις απλοειδείς σπερματίδες

Ένας σημαντικός όγκος δεδομένων που προέρχεται από τα πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής και ανοσοκατακρήμνισης αναδεικνύει την παρουσία «ενδιάμεσων καταστάσεων χρωματίνης». Αυτή αντικατοπτρίζεται στη σταδιακή εναλλαγή μεταξύ συνδυασμών της H3K4me₃, της H3R8me₂ και της H3T3ph και συνάδει με την προοδευτική συμπύκνωση της χρωματίνης, αλλά και τον εκφυλισμό του μεταγραφικού μηχανισμού. Η απελευθέρωση του ώριμου σπέρματος και η μετάβαση από τη φάση της καλύπτρας στην ακροσωμική φάση σηματοδοτεί την ενεργοποίηση της Haspin στις απλοειδείς σπερματίδες και την απόθεση της H3T3ph στη χρωματίνη (εικ. 55, κέντρο). Αλλαγές στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών μεταβάλλουν το φορτίο των ινών χρωματίνης και συμβάλλουν στην αλλαγή της αρχιτεκτονικής τους

(συμπύκνωση/ αποσυμπύκνωση)⁽²⁵⁴⁾. Η αλλαγή στην κατάσταση φωσφωρυλίωσης της H3T3, μετά από προσθήκη του αναστολέα 5-ITU, προκαλεί μεταβολές στην έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη ρύθμιση της μιτωτικής διαίρεσης, την επεξεργασία του RNA, σε ιστόνες και πρωτεΐνες που συνδέονται με την αναδιοργάνωση της χρωματίνης όπως είναι οι DNA και RNA πολυμεράσες ή ελικάσες⁽⁸⁹⁾.

Η H3K4me₃ συνδέεται με την ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας, ενώ η δι-μεθυλίωση *in trans* της H3R8 (H3R8me₂^{asym}) από την PRMT2 συνδέεται με την ενεργοποίηση, αλλά και με τη διατήρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας σε γονίδια-στόχους στο γλοιοβλάστωμα⁽²⁵⁵⁾. Σε μιτωτικά διαιρούμενα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα η φωσφωρυλίωση της θρεονίνης 3 στην ιστόνη H3 οδηγεί σε αποσύνδεση του συμπλόκου TFIID/TAF3/RNAPII και άρα παύση της μεταγραφικής δραστηριότητας⁽²³⁶⁾. Ταυτόχρονα, αποτρέπει την αναγνώριση της διπλανής τρι-μεθυλιωμένης λυσίνης 4 από το ADD domain της Dnmt3a και οδηγεί τελικά σε συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων⁽²⁵⁶⁾.

Με βάση τα στοιχεία αυτά, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι κατά τη μετάβαση από τις πρώιμες στις όψιμες απλοειδείς σπερματίδες συμβαίνει μια σταδιακή μεταβολή ποσόστωσης από την H3T3K4me₃R8me₂, στην H3T3K4me₃R8me₂ και τελικά στην H3T3phK4me₃R8me₂, χωρίς ωστόσο να απουσιάζουν οι ενδιάμεσοι συνδυασμοί. Φαίνεται δηλαδή ότι στην πορεία της σπερμιόγνεσης συμβαίνει μια μετάβαση από μια κατάσταση «ανοιχτής» χρωματίνης (permissive chromatin state) που χαρακτηρίζεται από την παρουσία της H3K4me₃ και είναι δυνατόν να μεταγραφεί, σε μία ενδιάμεση κατάσταση (H3R8me₂) και τελικά σε μια κλειστή (H3T3ph), η οποία δεν μεταγράφεται.

4.4 Η Haspin ως επιγενετικός ρυθμιστής της σπερματογένεσης

Η παρουσία της Haspin στα σπερματοκύτταρα αλλά και τους σωματικούς ιστούς έχει περιγραφεί από μια πληθώρα ερευνητικών ομάδων. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν, σε συνδυασμό με τα πειραματικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ίσως ο ρόλος της υπό μελέτη κινάσης στην ολοκλήρωση των μιτωτικών διαιρέσεων να είναι επικουρικός και η κύρια λειτουργία της να αφορά τη ρύθμιση της σπερματογένεσης.

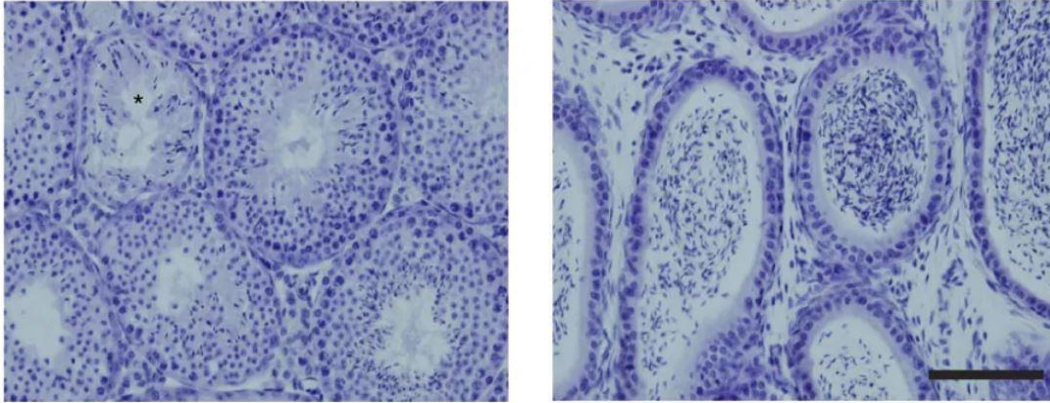
Μια σειρά παρατηρήσεων ενισχύουν την παραπάνω άποψη. Πρώτον, η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης της στα σωματικά κύτταρα δεν επιφέρει δραματικές αλλαγές στην ολοκλήρωση της μιτωτικής διαίρεσης, εκτός από μια μικρή καθυστέρηση κατά τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση. Δεύτερον, η απαλοιφή της Haspin από τα σωματικά κύτταρα έχει παρόμοια επίδραση στη μίτωση με την υπερέκφραση ή την αναστολή της καταλυτικής της δραστηριότητας^(88, 94). Τρίτον, σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που υπερεκφράζουν ή δεν διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της Haspin

δεν επιδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης παραγόντων πολυδυναμίας, όπως το Nanog και το Oct4 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου E14, παρόλο που ο κυτταρικός κύκλος συνδέεται άμεσα με τη διατήρηση της πολυδυναμίας στα ESCs (π.χ. φωσφορυλίωση της Oct4 S229 κατά την G2/M από την Aurora B και αποφωσφορυλίωσή της από την PP1 κατά την M/G1) (Shin and Youn, 2016²⁵⁷). Ακόμη, τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να σχηματίσουν εμβρυοειδή σωματίδια, μετά από την αφαίρεση του παράγοντα LIF από το θρεπτικό μέσο, αν και παρουσιάζουν ένα μη φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης ιστο-ειδικών δεικτών⁽²¹²⁾.

Θα πρέπει να αναφερθεί επίσης ότι η κινάση αυτή εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε μειωτικούς και μετα-μειωτικούς πληθυσμούς κυττάρων του όρχεως, όπου και ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά^(71, 75, 77). Από τις αρχικές ακόμα μελέτες έχει προταθεί ότι ίσως να συμμετέχει στη συμπύκνωση της χρωματίνης και την αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες⁽⁹⁰⁾. Επιπλέον, ο υποκινητής του γονιδίου της παρουσιάζει διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ σωματικών και γαμετικών ιστών⁽⁷⁷⁾. Ακόμα και η ίδια η δομή του γονιδίου GSG2 προσομοιάζει αυτή άλλων ειδικών για τη σπερματογένεση γονιδίων. Όμοια με την Haspin, το PGK-2 (phospho-glycerate kinase 2) και η pyruvate dehydrogenase e2a είναι γονίδια που εκφράζονται μόνο στα αρσενικά γαμετικά κύτταρα και δεν διαθέτουν ιντρόνια. Ειδικότερα, το mRNA της PGK-2 ανιχνεύεται για πρώτη φορά κατά την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και η ποσότητά του αυξάνεται κατά τη μετα-μειωτική διαφοροποίηση^(258, 259). Υπάρχουν πολλά, ειδικά για τη σπερματογένεση, γονίδια που έχουν γενομική δομή χωρίς ιντρόνια. Αυτά προήλθαν κατά πάσα πιθανότητα από τα προγονικά μέσω ρετρομετάθεσης, κάτι που υποδηλώνεται από την παρουσία της Alu επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των γονιδίων χαρτογραφείται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα (π.χ. CAPZA3, GK2, PRM3) και οι πολυμορφισμοί στην αλληλουχία τους συνδέονται με την εμφάνιση στειρότητας⁽²⁶⁰⁾.

Ποντίκια που δε διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο της Haspin παρουσιάζουν προβλήματα σε ορισμένα σπερματοκύτταρα του όρχεως, αν και έχουν κανονικό σωματικό βάρος και όργανα⁽¹⁴⁰⁾. Από την εικόνα 79 (σωληνάριο σημειωμένο με *, σε σύγκριση με την εικόνα 43) είναι εμφανές ότι πρόκειται για σπερματοφόρο σωληνάριο σταδίου I-IV, από το οποίο απουσιάζουν κάποια σπερματογόνια (1^η γενιά), σπερματοκύτταρα (2^η γενιά) και απλοειδείς σπερματίδες (3^η γενιά), όχι όμως και το συμπυκνωμένο σπέρμα (4^η γενιά) που προέρχεται από τον προηγούμενο κύκλο ανάπτυξης του επιθηλίου. Η παρουσία σπερματοφόρων σωληναρίων με τυπική ανάπτυξη είναι δυνατόν να εξηγηθεί από την παρουσία εναλλακτικών μηχανισμών για τη συγκρότηση του CPC στα κεντρομερίδια μιτωτικά διαιρούμενων κυττάρων, όπως άλλωστε έχει προταθεί και από τους συγγραφείς. Η ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτών όμως δεν είναι καθολική και για το λόγο αυτό ένα

τμήμα του επιθηλίου αναπτύσσεται κανονικά και ένα άλλο όχι. Από τα παραπάνω, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι απουσία της Haspin, η H3T3 δεν φωσφορυλιώνεται και αυτό αναστέλλει τη διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων του όρχεως προκαλώντας προβλήματα σε όλη τη σπερματογένεση.



Εικόνα 79. Τα Haspin^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν προβλήματα σε ένα τμήμα του επιθηλίου του όρχεως. Αριστερά εμφανίζονται τομές όρχι και δεξιά τομές επιδιδυμίδας. Χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης. Scale bars, 100 μm⁽¹⁴⁰⁾.

Ωστόσο, ο φαινότυπος των Haspin^{-/-} ποντικών δεν είναι η μοναδική ένδειξη ότι η Haspin έχει κυρίαρχο ρόλο σε ολόκληρη τη σπερματογένεση. Το AKAP4 (AKAP82) είναι μια δομική πρωτεΐνη (scaffold protein) που είναι υπεύθυνη για την κινητικότητα της ουράς του σπέρματος, συμμετέχει στο μονοπάτι σηματοδότησης της protein kinase A, ενώ αποτελεί και δείκτη έναντι του καρκίνου του όρχεως (cancer-testis antigen). Η έκφρασή του ανιχνεύεται για πρώτη φορά σε στρογγυλές σπερματίδες βήματος 1-6, μεγιστοποιείται κατά τα βήματα 8-12 και φθίνει από το βήμα 13 και έπειτα. Ποντίκια που δε διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο του AKAP4 (KO mice) έχουν προβλήματα στη μορφολογία του σπέρματος, στην κινητικότητά του και είναι στείρα. Πειράματα αλληλούχισης RNA μεμονωμένων κυττάρων (single-cell RNA sequencing) έδειξαν ότι απουσία του AKAP4 επηρεάζεται η έκφραση της Haspin σε σπερματοκύτταρα και στρογγυλές σπερματίδες και του Ccdc38 σε σπερματογόνια και σπερματοκύτταρα^(61, 262). Παράλληλα, αλληλούχιση RNA-νέας γενιάς (NGS RNA-sequencing) έδειξε ότι η υπερέκφραση της Haspin σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα επηρεάζει την έκφραση του Ccdc38⁽²¹²⁾. Συνεπώς, είναι δυνατόν η ενεργοποίηση της Haspin στις όψιμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες να βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του AKAP4 και να επηρεάζει τη μορφολογία του σπέρματος έμμεσα, μέσω της διαμεσολάβησης της συμπύκνωσης της χρωματίνης στην κεφαλή του. Τέλος η απαλοιφή του γονιδίου της Haspin σε εμβρυονικά

βλαστικά κύτταρα επηρεάζει γονίδια του χρωμοσώματος Y, τα οποία είναι σημαντικά για τη σπερματογένεση. Αυτά βρίσκονται σε δυο σημαντικούς γενετικούς τόπους. Ο πρώτος σχετίζεται με την αζωοσπερμία (AZFa, azoospermia factor a) και περιλαμβάνει τα γονίδια UTY και DDX3Y. Ο δεύτερος σχετίζεται με μια λιγότερο συχνή μορφή καρκίνου του όρχεως, το γοναδοβλάστωμα (GBY, gonadoblastoma locus on Y chromosome) και περιλαμβάνει τα γονίδια ZFY και TSPY⁽²⁶³⁻²⁶⁷⁾.

Τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας διατριβής βελτίωσαν τη μέχρι σήμερα εικόνα για το λειτουργικό ρόλο της Haspin. Ένα μεγάλο ερωτηματικό παραμένει όμως εξαιτίας της αδυναμίας ταυτοποίησης του ακριβούς προτύπου κατανομής της τόσο στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, όσο και στους γαμέτες. Ο πιο άμεσος στόχος είναι η επιβεβαίωση της ύπαρξης συνδυασμών του μοτίβου PMM στο περιβάλλον του όρχι με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας. Η εφαρμογή τεχνικών όπως ο υβριδισμός *in situ* και ο διαχωρισμός κυττάρων με καταβύθιση (gravity sedimentation) θα διαλευκάνουν την κατανομή της στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ακόμη, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και αλληλούχισης χρωματίνης (ChIP/ChIP-seq.) από ιστό όρχεως ενήλικου και νεαρού ποντικίου θα διευκρινίσουν τα γονίδια στόχους της υπό μελέτη κινάσης κατά το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης, αλλά και στην ενήλικη-σταθερή κατάσταση. Συμπληρωματικά προς τα παραπάνω, η χρήση μικρομοριακών αναστολέων της Haspin, όπως ο 5-ITU, σε βασικά στάδια της σπερματογένεσης θα αναδείξει τη συμβολή της H3T3rh στη συμπύκνωση της χρωματίνης και τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης των απλοειδών σπερματίδων. Αναφορικά με τη συμμετοχή της σε παθολογικές καταστάσεις του όρχεως, όπως είναι η αζωοσπερμία ή το γοναδοβλάστωμα, οι ενδείξεις είναι αρκετές, απαιτείται ωστόσο εκτεταμένος έλεγχος για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Τέλος είναι σημαντικό να εξακριβωθεί η πιθανή συμμετοχή της H3T3rh:

- 1) Στη δημιουργία ή/και τη λύση των συνάψεων κατά την πρόφαση I,
- 2) Στη συγκρότηση του CPC κατά τη μειωτική διαίρεση και
- 3) Στη διαμεσολάβηση της συνοχής μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων και αδελφών χρωματίδων.

5. Συμπεράσματα

- Η τροποποίηση H3T3rh (P3) που καταλύεται από την κινάση Haspin ανιχνεύεται σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια, τόσο κατά το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης (ποντίκια 7dpp, 17dpp και 24dpp), όσο και στα ενήλικα ποντίκια.
- Η PMM-υπογραφή (H3T3rhK4me₃R8me₂) εντοπίζεται σε σπερματογόνια νεαρών ποντικών ηλικίας 7, 17 και 24 ημερών (πρώτο κύμα της σπερματογένεσης) και στα ενήλικα ζώα κατά τη διάρκεια της μίτωσης.
- Η κατανομή της H3T3rh και του μοτίβου PMM στα μιτωτικά σπερματογόνια ομοιάζει με αυτή των μιτωτικά διαιρούμενων σωματικών κυττάρων. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε ο εντοπισμός των τροποποιήσεων αυτών και στους χρωμοσωμικούς βραχίονες κατά τη μετάφαση.
- Οι υπό μελέτη τροποποιήσεις συμμετέχουν στις δυο μειωτικές διαιρέσεις. Η H3T3rh απουσίαζε από την πρόφαση I και τη διακίνηση, ενώ εντοπίστηκε σε περικεντρομεριδιακές περιοχές και κατά μήκος των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση I. Το πρότυπο αυτό περιορίστηκε σταδιακά στα κεντρομερίδια κατά την ανάφαση I και την τελόφαση I. Μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης (interkinesis), η H3T3rh ανιχνεύθηκε μόνο σε περικεντρομεριδιακές περιοχές. Την ίδια κατανομή διατήρησε έως τη μετάφαση II. Η τριπλή τροποποίηση PMM ανιχνεύτηκε επιπλέον στη διακίνηση και τη προμετάφαση I.
- Η H3T3rh ανιχνεύτηκε σε ώριμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες απλοειδείς σπερματίδες βήματος 8-10 που διανύουν την ακρωσωμική φάση (acrosomal phase) της σπερμιογένεσης. Οι δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής επιβεβαίωσαν την ειδικότητα του αντισώματος και έδειξαν ότι η αναστολή που προκαλείται από το H3T3rhK4R8 πεπτίδιο είναι δοσο-εξαρτώμενη.
- Η ανίχνευση της φωσφορυλίωσης που καταλύεται από την Haspin σε μη επικαλυπτόμενα διαστήματα στην πορεία διαφοροποίησης του σπέρματος δείχνει ότι η υπό μελέτη κινάση εκφράζεται ή/και ενεργοποιείται με διακοπτόμενο τρόπο κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης.
- Οι δύο μεθυλίωσεις που ολοκληρώνουν την υπογραφή PMM (H3K4me₃-H3R8me₂) εγκαθίστανται νωρίτερα από την H3T3rh σε πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες βήματος 5-7, κατά τη φάση της καλύπτρας (cap phase).
- Η τροποποίηση H3T3rh και το μοτίβο PMM καταλαμβάνουν περιοχές χαλαρής χρωματίνης στις μετα-μειωτικές απλοειδείς σπερματίδες όπου εντοπίζονται. Επιπλέον, οι τροποποιήσεις μεθυλίωσης (H3K4me₃, H3R8me₂, H3K9me₃) βρέθηκαν να εγκαθίστανται νωρίτερα από αυτές της φωσφορυλίωσης (H3T3rh, H3S10ph) στις απλοειδείς σπερματίδες.

- Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της Haspin σε σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού επηρεάζουν την έκφραση ειδικών για τη σπερματογένεση γονιδίων, όπως το SCML2 και το DAZL. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών συνυπάρχουν με την H3T3ph στις όψιμες στρογγυλές και επιμηκυνόμενες σπερματίδες.
- Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανοσοαποτύπωσης κατά western έδειξαν ότι τα κύτταρα του όρχεως φέρουν υποπληθυσμούς νουκλεοσωμάτων με εναλλαγές τροποποιήσεων φωσφορυλίωσης-μεθυλίωσης, στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3.
- Κατά τη σπερμιογένεση, συνδυασμοί του μοτίβου PMM ταυτοποιήθηκαν διαδοχικά σε απλοειδείς σπερματίδες βήματος 5-7 και 8-10. Οι δοκιμασίες ανταγωνιστικής αναστολής έδειξαν ότι στους πρώιμους τύπους κυττάρων επικρατούν οι μεθυλίώσεις (H3K4me₃, H3K4me₃R8me₂ και H3R8me₂), ενώ στους όψιμους συνδυασμοί της τριπλής τροποποίησης (H3T3phK4me₃R8me₂, H3T3phK4me₃, H3T3phR8me₂, H3K4me₃R8me₂, H3T3ph, H3K4me₃).

6. Περιλήψεις

Περίληψη στα ελληνικά

Η Haspin είναι μια κινάση Ser/Thr που ανακαλύφθηκε σε σπερματοκύτταρα όρχεως ποντικού το 1994, από τους Tanaka et al. Έκτοτε η λειτουργία της έχει συνδεθεί με τη μιτωτική διαίρεση των σωματικών κυττάρων. Ο ρόλος της συνοψίζεται σε τέσσερα βασικά σημεία: α) τη φωσφορυλίωση της H3T3, β) τη συγκρότηση του CPC στα κεντρομερίδια κατά την έναρξη της μιτωτικής διαίρεσης (μέσω της σύνδεσης H3T3rh-Survivin), γ) την προστασία της κεντρομεριδιακής συνοχής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων έως τη μετάφαση/ανάφαση (μέσω του μοτίβου PIM στο αμινο-τελικό της άκρο) και δ) την αναστολή της μεταγραφής κατά τη διάρκεια της μίτωσης (μέσω του H3T3rh/H3K4me₃ διακόπτη φωσφορυλίωσης/μεθυλίωσης). Εκφράζεται σε παχυνταίνικα σπερματοκύτταρα και μιτωτικά ενεργούς ιστούς. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα επίπεδα του RNA της παρουσιάζουν ετερογένεια μεταξύ ιστών και κυτταρικών τύπων, ενώ και ο υποκινητής της παρουσιάζει διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης σε σωματικούς ιστούς, σε γαμετικούς ιστούς και σε σειρές βλαστικών κυττάρων.

Τα δεδομένα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποκαλύπτουν την πολύπλευρη λειτουργία της Haspin στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και στους αρσενικούς γαμέτες του ποντικίου. Στους τελευταίους, η έκφραση ή/και η ενεργοποίησή της είναι διακοπτόμενη, καθώς μεσολαβούν χρονικά διαστήματα εντός της σπερματογένεσης όπου η φωσφορυλίωση που καταλύει η συγκεκριμένη κινάση δεν ανιχνεύεται.

Αρχικά, ταυτοποιήθηκε η παρουσία της σε μιτωτικά διαιρούμενα σπερματογόνια και μειωτικά διαιρούμενα σπερματοκύτταρα, διαμέσου της H3T3rh. Στα μιτωτικά σπερματογόνια βρέθηκε σε περικεντρομεριδιακές περιοχές αλλά και στους βραχίονες των χρωμοσωμάτων. Η κατανομή αυτή δεν διαφοροποιήθηκε από το πρώτο κύμα της σπερματογένεσης, στα ενήλικα ποντίκια. Η ίδια τροποποίηση απουσίαζε από σπερματοκύτταρα κατά την πρόφαση I και τη διακίνηση, εντοπίστηκε όμως από τη μετάφαση I έως και τη μετάφαση II. Ενώ στην πρώτη μειωτική διαίρεση εντοπίστηκε τόσο στις περικεντρομεριδιακές περιοχές, όσο και μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων, η κατανομή της βρέθηκε να περιορίζεται σταδιακά πλησίον των κεντρομεριδίων από την ανάφαση I, μέχρι το τέλος της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι στις μιτωτικές διαιρέσεις των σπερματοκυττάρων είναι υπεύθυνη για τη συγκρότηση του CPC και την προστασία της συνοχής των αδελφών χρωματίδων, όπως και στα σωματικά κύτταρα. Ακόμη, είναι δυνατόν να υποβοηθά την ανατροφοδότηση του κύκλου ενεργοποίησης του CPC και την προστασία της συνοχής, σε συνεργασία με την Rec8, κατά τη διάρκεια των μειωτικών διαιρέσεων.

Μετά από ένα διάστημα απουσίας κατά τον κύκλο ωρίμανσης του επιθηλίου του όρχεως, η H3T3rh βρέθηκε σε ευχρωματινικές περιοχές απλοειδών σπερματίδων πριν

την έναρξη της υπερ-συμπύκνωσης του γενετικού υλικού στην κεφαλή του ώριμου σπέρματος. Παράλληλα, δείχθηκε ότι η απαλοιφή του γονιδίου της και η υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα επηρεάζουν σημαντικά για τη σπερματογένεση γονίδια, όπως το SCML2 και το DAZL. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών βρέθηκαν να συνυπάρχουν με την H3T3rh στις ευχρωματινικές περιοχές όψιμων στρογγυλών και επιμηκυνόμενων σπερματίδων βήματος 8 έως 10.

Ταυτόχρονα με τα παραπάνω, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της τριπλής τροποποίησης PMM σε μιτωτικά και μειωτικά διαιρούμενα κύτταρα του όρχεως. Αποδείχθηκε ότι η εγκατάσταση των τροποποιήσεων μεθυλίωσης προηγείται της εγκατάστασης της φωσφορυλίωσης που ολοκληρώνει την PMM-υπογραφή στις απλοειδείς σπερματίδες.

Τα πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής, σε συνδυασμό με την ανοσοκατακρήμιση, έδειξαν ότι στους όρχεις υπάρχουν «ενδιάμεσες καταστάσεις χρωματίνης», οι οποίες αντικατοπτρίζονται στην εναλλαγή συνδυασμών του μοτίβου PMM. Η παρουσία των μεθυλίώσεων στους πρώιμους κυτταρικούς τύπους και της φωσφορυλίωσης στους όψιμους αναδεικνύει τη συμμετοχή της H3T3rh στους μηχανισμούς ελέγχου της συμπύκνωσης της χρωματίνης και της μεταγραφικής δραστηριότητας.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα, υπέδειξαν ότι ίσως η Haspin να έχει επικουρικό ρόλο στις μιτωτικές διαιρέσεις των σωματικών κυτάρων και κύριο στη ρύθμιση της σπερματογένεσης. Ειδικότερα, στις απλοειδείς σπερματίδες ίσως η H3T3rh, σε συνδυασμό με την H3K4me₃ και την 3R8me₂, να λειτουργεί ως διακόπτης ελέγχου της έκφρασης τόσο των γονιδίων στόχων, όσο και των καταστολέων τους. Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση της Haspin με πρωτεΐνες-ρυθμιστές στο περιβάλλον του όρχεως. Η παρουσία αμφίσημων τροποποιήσεων στο αμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H3 και ο ρόλος τους στη διατήρηση μιας «ενδιάμεσης κατάστασης» στους υποκινητές γονιδίων που αυτές βρίσκονται είναι καλά τεκμηριωμένα στη βιβλιογραφία. Περαιτέρω έλεγχος της παρουσίας της Haspin στα διάφορα στάδια, με τεχνικές in situ υβριδισμού, θα δώσει απαντήσεις για το ρόλο της κατά τη γαμετογένεση

THE ROLE OF MITOTIC KINASES IN ASYMMETRIC CELL DIVISION.

Functional role of the mitotic kinase Haspin in mouse embryonic stem cells and male gametes.

Theofani Kiosse

Abstract

Haspin is a Ser/Thr protein kinase that was originally discovered in mouse spermatocytes by Tanaka and coworkers in 1994. Since then, its function has been closely associated with mitotic divisions in somatic cells. Its functions include: a) phosphorylation of H3T3, b) regulation of CPC localization on mitotic centromeres during early prophase (through the H3T3ph-Survivin interaction), c) participation in centromeric cohesion protection between sister chromatids up to metaphase/anaphase transition (through the PIM motif on its amino-terminal sequence) and d) inhibition of transcription initiation during mitosis (through the H3T3ph/H3K4me₃ phospho-methyl switch). Haspin is expressed in pachytene spermatocytes and mitotically dividing tissues. According to various reports its RNA levels vary amongst tissues and tissue-cultured cells, while its promoter is differentially methylated in somatic tissues, germinal tissues and embryonic stem cell lines.

The experimental results of this thesis have proven that Haspin regulates many aspects of both mouse embryonic stem cell and male gamete's function. In the latter, its expression and/or activation are intermittent, since H3T3ph cannot be detected at several stages of the spermatogenic process.

In the context of this thesis Haspin was initially detected in mitotic spermatogonia and meiotic spermatocytes, indirectly via H3T3ph. Centromeric regions and chromosome arms of mitotic spermatogonia were occupied by H3T3ph and this distribution pattern did not diversify from the first wave of spermatogenesis, to the adult steady state. The same modification was absent from prophase I and diakinesis of spermatocytes, but it was present in metaphase I and metaphase II. During the first meiotic division, it was detected in pericentromeric regions and between homologous chromosomes. This pattern gradually receded around centromeres from anaphase I, until the end of the second meiotic division. These data indicate that in the course of mitotic divisions of spermatogonia, Haspin is responsible for CPC localization and centromeric cohesion protection, as in somatic cells. Additionally, it is possible that Haspin is involved in activation feedback loops and in assisting Rec8 concerning cohesion protection during meiotic divisions.

After a period of absence, in the course of the spermatogenic cycle, H3T3ph reappeared in euchromatic regions of haploid spermatids, just before DNA hyper-compaction was initiated at the head of the mature sperm. In parallel, it has been shown that Haspin knockout and overexpression, in mouse embryonic stem cells, affects spermatogenesis-related genes, such as SCML2 and DAZL. Those gene products have also been detected, along with H3T3ph, in the euchromatic regions of haploid late round and elongating spermatids, at steps 8-10.

At the same time, the PMM motif was detected in mitotic and meiotic dividing cells of the testis. Competition assays have proven that the methyl- modifications of this motif are established earlier than the phosphorylation in haploid spermatids of stage V-VII and VIII-X tubules.

The competition assays, in combination with the immunoprecipitation experiments have indicated that “poised chromatin” states exist in late spermatogenesis. These are depicted in alternating combinations of the PMM motif components. Methylation marks exist in earlier stages than phosphorylation, which appears in later. This indicates that H3T3ph is involved in chromatin compaction and transcription regulation.

All the above data, have suggested that Haspin might have an auxiliary role in the mitotic machinery in somatic cells. Its main role could be that of a regulatory component of spermatogenesis. Specifically in haploid spermatids, Haspin could regulate the expression of spermatogenesis-specific genes and their repressors, through the formation of a phospho-methyl switch between H3T3ph, H3K4me₃ and H3R8me₂.

Based on these data, it is of outmost importance to study the interaction of Haspin with regulatory proteins in a testis environment. The presence of equivocal modifications on the H3 tail and their role in regulating “poised chromatin” on promoter regions is well documented in the bibliography. Detailed characterization of the stages during which Haspin is expressed, through in situ hybridization assays, will provide answers for its exact role in gametogenesis.

Βιβλιογραφία

1. Mattaj JW. Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004;5(1):65–69.
2. Georgatos SD. The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO J*. 2001;20:2989-2994.
3. Jackson DA. The Cell Nucleus: Biogenesis, Structure, and Function. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. 2011. doi:10.1002/3527600906.mcb.200300097.
4. Skinner BM and Johnson EEP. Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance. *Chromosoma*. 2017;126(2):195-212.
5. Grewal SIS and Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet*. 2007;8(1):35-46.
6. Woodcock CL and Ghosh RP. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(5):a000596.
7. Luger K, Mäder AW, Richmond RK et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251-60.
8. Wolffe AP. Histone Genes. *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press. 2001;948-952.
9. Davie JR and Chadee DN. Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:203-13.
10. Akey CW and Luger K. Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol*. 2003;13(1):6-14.
11. Hansen JC. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2002;31:361-92.
12. Robinson PJ and Rhodes D. Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*. 2006 Jun;16(3):336-43.
13. Albig W and Doenecke D. The human histone gene cluster at the D6S105 locus. *Hum Genet*. 1997;101(3):284-94.
14. Talbert PB and Henikoff S. Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(2):115-126.
15. Henikoff S and Smith MM. Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(1):a019364.
16. Biterge B and Schneider R. Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res*. 2014;356(3):457-66.
17. Bao J and Bedford MT. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction*. 2016;151(5):R55-70.

18. Sarma K and Reinberg D. Histone variants meet their match. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005;6(2):139–149.
19. Shinagawa T, Huynh L M, Takagi T et al. Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development*. 2015;142:1287–1292.
20. Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S et al. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev*. 2013;27:1680–1692.
21. Thakar A, Gupta P, Ishibashi T et al. H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. *Biochemistry*. 2009;(48):10852–10857.
22. Chen P, Zhao J, Wang Y et al. H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes & Development*. 2013;27:2109–2124.
23. Bramlage B, Kosciessa U and Doenecke D. Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation*. 1997;62(1):13-20.
24. Yuen BT, Bush KM, Barrilleaux BL et al. Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development*. 2014;141(18):3483-94.
25. Bush KM, Yuen BT, Barrilleaux BL et al. Endogenous mammalian histone H3.3 exhibits chromatin-related functions during development. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6(1):7.
26. Tachiwana H, Osakabe A, Kimura H and Kurumizaka H. Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(7):2208-18.
27. Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A et al. Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(23):10454–10459.
28. Amor DJ, Kalitsis P, Sumer H, Choo KH. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol*. 2004;14(7):359-68.
29. Yoda K, Ando S, Morishita S et al. Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:7266–7271.
30. Izzo A, Kamieniarz K and Schneider R. The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biol Chem*. 2008;389(4):333–343.
31. De Lucia F, Faraone-Mennella MR, D'Erme M et al. Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(1):32-9.

32. Khadake JR and Rao MR. DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry*. 1995;34(48):15792-801.
33. Catena R, Ronfani L, Sassone-Corsi P and Davidson I. Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. *Dev Biol*. 2006;296(1):231-238.
34. Tanaka H, Iguchi N, Isotani A et al. HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*. 2005;25(16):7107-19.
35. Yan W, Ma L, Burns KH and Matzuk MM. HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10546-51.
36. Iguchi N, Tanaka H, Yamada S et al. Control of mouse hils1 gene expression during spermatogenesis: identification of regulatory element by transgenic mouse. *Biol Reprod*. 2004;70(5):1239-45.
37. Mishra LN, Gupta N and Rao SM. Mapping of post-translational modifications of spermatid-specific linker histone H1-like protein, HILS1. *J Proteomics*. 2015;128:218-30.
38. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
39. Patel DJ and Wang Z. Readout of epigenetic modifications. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:81-118.
40. Lahn BT, Tang ZL, Zhou J et al. Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8707-12.
41. Greer EL and Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):343–357.
42. Brunner AM, Nanni P and Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin*. 2014;7:2.
43. Rossetto D, Avvakumov N and Côté J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*. 2012;7(10):1098–1108.
44. Cao J and Yan Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol*. 2012 Mar 12;2:26.
45. Weake VM and Workman JL. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*. 2008;29(6):653-63.
46. Sin HS, Barski A, Zhang F et al. RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev*. 2012;26(24):2737-48.

47. Cubeñas-Potts C and Matunis MJ. SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function. *Dev Cell*. 2013;24(1):1-12.
48. Shio Y and Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13225-30.
49. Messner, S and Hottiger MO. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in Cell Biology*, 2011;21(9):534–542.
50. Farrelly LA, Thompson, RE, Zhao S et al. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature*. 2019;567:535–539.
51. Fu L and Zhang L. Serotonylation: A novel histone H3 marker. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4:15.
52. Fischle W, Wang Y and David Allis C. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*. 2003;425(6957):475–479.
53. Van Wely KH, Mora Gallardo C, Vann KR and Kutateladze TG. Epigenetic countermarks in mitotic chromosome condensation. *Nucleus*. 2017;8(2):144-149.
54. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2006;125(2):315-26.
55. Sha K and Boyer LA. The chromatin signature of pluripotent cells. *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008.
56. Tanaka T, Fuchs J, Loidl J and Nasmyth K. Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol*. 2000;2(8):492-9.
57. Peters JM and Nishiyama T. Sister chromatid cohesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11).
58. Losada A, Yokochi T and Hirano T. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 10):2133-41.
59. Haarhuis JHI, van der Weide RH, Blomen VA et al. The cohesin release factor WAPL restricts chromatin loop extension. *Cell*. 2017;169(4):693-707.e14.
60. Antonin W and Neumann H. Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;40:15-22.
61. Kumar GS, Gokhan E, De Munte et al. The Ki-67 and RepoMan mitotic phosphatases assemble via an identical, yet novel mechanism. *Elife*. 2016;5. pii: e16539.
62. Vagnarelli P, Ribeiro S, Sennels L et al. Repo-Man coordinates chromosomal reorganization with nuclear envelope reassembly during mitotic exit. *Dev Cell*. 2011;21(2):328-42.

63. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H and Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):789-803.
64. Klein UR, Nigg EA and Gruneberg U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell.* 2006;17(6):2547-58.
65. Mallm JP and Rippe K. Aurora Kinase B Regulates Telomerase Activity via a Centromeric RNA in Stem Cells. *Cell Rep.* 2015;11(10):1667-78.
66. Zierhut C and Funabiki H. Nucleosome functions in spindle assembly and nuclear envelope formation. *Bioessays.* 2015;37(10):1074-85.
67. Van der Horst A and Lens SM. Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma.* 2014;123(1-2):25-42.
68. Krenn V and Musacchio A. The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Front Oncol.* 2015;5:225.
69. Campbell CS and Desai A. Tension sensing by Aurora B kinase is independent of survivin-based centromere localization. *Nature.* 2013;497(7447):118-21.
70. Kitagawa M and Lee SH. The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:14.
71. Tanaka H, Yoshimura Y, Nishina Y et al. Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett.* 1994;355(1):4-10.
72. Matsui M, Ichihara H, Kobayashi S et al. Mapping of six germ-cell-specific genes to mouse chromosomes. *Mamm Genome.* 1997;8(11):873-4.
73. Wakasugi N. A genetically determined incompatibility system between spermatozoa and eggs leading to embryonic death in mice. *J Reprod Fertil.* 1974;41(1):85-96.
74. Tanaka H, Iguchi N, Nakamura Y et al. Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(3):211-8.
75. Tanaka H, Yoshimura Y, Nozaki M et al. Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem.* 1999;274(24):17049-57.
76. Higgins JMG. The Haspin gene: location in an intron of the integrin alphaE gene, associated transcription of an integrin alphaE-derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells. *Gene.* 2001a;267(1):55-69.
77. Sato S, Maeda C, Hattori N et al. DNA methylation-dependent modulator of Gsg2/Haspin gene expression. *J Reprod Dev.* 2011;57(4):526-33.

78. Nguyen AL, Gentilello AS, Balboula AZ et al. Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes. *J Cell Sci.* 2014; 127(23): 5066–5078.
79. Higgins JMG. Haspin-like proteins: a new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci.* 2001b;10(8):1677-84.
80. Tokuhiro K, Miyagawa Y, Yamada S, et al. The 193-base pair Gsg2 (haspin) promoter region regulates germ cell-specific expression bidirectionally and synchronously. *Biol Reprod.* 2007;76(3):407-14.
81. Eckert D, Buhl S, Weber S et al. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* 2005;6(13):246.
82. Zhou L, Liang C, Chen Q, et al. The N-Terminal Non-Kinase-Domain-Mediated Binding of Haspin to Pds5B Protects Centromeric Cohesion in Mitosis. *Curr Biol.* 2017;27(7):992-1004.
83. Ghenoiu C, Wheelock MS and Funabiki H. Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol Cell.* 2013;52(5):734-45.
84. Eswaran J, Patnaik D, Filippakopoulos P, et al. Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(48):20198-203.
85. Villa F, Capasso P, Tortorici M, et al. Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(48):20204-9.
86. Higgins JMG. Structure, function and evolution of haspin and haspin-related proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(3):446-62.
87. Higgins JMG. Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma.* 2010; 119(2): 137–147.
88. Dai J, Sultan S, Taylor SS and Higgins JMG. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* 2005; 19(4): 472–488.
89. Maiolica A, de Medina-Redondo M, Schoof EM, et al. Modulation of the chromatin phosphoproteome by the Haspin protein kinase. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(7):1724-40.
90. Dai J and Higgins JMG. Haspin: A mitotic kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle.* 2005;4(5):665-8.

91. Dai J, Sullivan BA and Higgins JM. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell*. 2006;11(5):741-50.
92. Dai J, Kateneva AV and Higgins JM. Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 22):4168-76.
93. Polioudaki H, Markaki Y, Kourmouli N, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett*. 2004;560(1-3):39-44.
94. Markaki Y, Christogianni A, Politou AS and Georgatos SD. Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 16):2809-19.
95. Cohen PTW. Protein Phosphatase 1 - targeted in many directions. *J Cell Sci*. 2002;115:241-256.
96. Trinkle-Mulcahy L, Andersen J, Lam YW et al. Repo-Man Recruits PP1 Gamma to Chromatin and Is Essential for Cell Viability. *J Cell Biol*. 2006;172(5):679-92.
97. Qian J, Lesage B, Beullens M et al. PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting. *Curr Biol*. 2011;21(9):766-73.
98. Vagnarelli P and Earnshaw WC. Repo-Man-PP1: A link between chromatin remodeling and nuclear envelope reassembly. *Nucleus*. 2012;3(2):138-42.
99. Espert A, Uluocak P, Bastos RN et al. PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J Cell Biol*. 2014;206(7):833-42.
100. Qian J, Beullens M, Huang J et al. Cdk1 orders mitotic events through coordination of a chromosome-associated phosphatase switch. *Nat Commun*. 2015;6:10215.
101. de Castro IJ, Budzak J, Di Giacinto ML, et al. Repo-Man/PP1 regulates heterochromatin formation in interphase. *Nat Commun*. 2017;8:14048.
102. Zhou L, Tian X, Zhu C et al. Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep*. 2014;15(3):273-81.
103. Combes G, Alharbi I, Braga LG and Elowe S. Playing polo during mitosis: PLK1 takes the lead. *Oncogene*. 2017;36(34):4819-4827.
104. Kelly AE, Ghenoiu C, Xue JZ et al. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science*. 2010;330(6001):235-9.
105. Wang F, Dai J, Daum JR, et al. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science*. 2010;330(6001):231-5.
106. Kim S, Kim NH, Park JE, et al. PRMT6-mediated H3R2me2a Guides Aurora B to Chromosome Arms for Proper Chromosome Segregation. *Nat. Commun*. 2020;11(1):612.

107. Beckier ME, Mazur T, Rashid MS and Taylor WR. Borealin dimerization mediates optimal CPC checkpoint function by enhancing localization to centromeres and kinetochores. *Nat Commun.* 2015;6:6775.
108. Wang F, Ulyanova NP, van der Waal MS et al. A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis. *Curr Biol.* 2011;21(12):1061-9.
109. Yu F, Jiang Y, Lu L, et al. Aurora-A promotes the establishment of spindle assembly checkpoint by priming the Haspin-Aurora-B feedback loop in late G2 phase. *Cell Discov.* 2017;3:16049.
110. Patnaik D, Jun Xian, Glicksman MA et al. Identification of small molecule inhibitors of the mitotic kinase haspin by high-throughput screening using a homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay. *J Biomol Screen.* 2008;13(10):1025-34.
111. Cuny GD, Ulyanova NP, Patnaik D, et al. Structure-activity relationship study of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(5):2015-9.
112. De Antoni A, Maffini S, Knapp S et al. A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. *J Cell Biol.* 2012;199(2):269-84.
113. Huertas D, Soler M, Moreto J et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin. *Oncogene.* 2012 Mar 15;31(11):1408-18.
114. Wang F Ulyanova NP, Daum JR et al. Haspin inhibitors reveal centromeric functions of Aurora B in chromosome segregation. *J Cell Biol.* 2012;199(2):251-68.
115. Zhang X, Jia D, Liu H et al. Identification of 5-Iodotubercidin as a genotoxic drug with anti-cancer potential. *PLoS One.* 2013;8(5):e62527.
116. Yamagishi Y, Honda T, Tanno Y and Watanabe Y. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science.* 2010;330(6001):239-43.
117. Tsukahara T, Tanno Y and Watanabe Y. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature.* 2010;467(7316):719-23.
118. Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T et al. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science.* 2010;327(5962):172-7.
119. Van der Waal MS, Saurin AT, Vromans MJ et al. Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B. *EMBO Rep.* 2012;13(9):847-54.
120. Bayliss R, Fry A, Haq T and Yeoh S. On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biol.* 2012;2(11):120136.

121. Hindriksen S, Lens SMA and Hadders MA. The Ins and Outs of Aurora B Inner Centromere Localization. *Front Cell Dev Biol.* 2017a;5:112.
122. Liang C, Zhang Z, Chen Q et al. Centromere-localized Aurora B Kinase Is Required for the Fidelity of Chromosome Segregation. *J Cell Biol.* 2020;219(2):e201907092.
123. Broad AJ, DeLuca KF and DeLuca JG. Aurora B Kinase Is Recruited to Multiple Discrete Kinetochore and Centromere Regions in Human Cells. *J Cell Biol.* 2020;219(3):e201905144.
124. Liu H, Qu Q, Warrington R et al. Mitotic transcription installs Sgo1 at centromeres to coordinate chromosome segregation. *Mol Cell.* 2015;59(3):426-36.
125. Hadders MA, Hindriksen S, Truong MA et al. Untangling the Contribution of Haspin and Bub1 to Aurora B Function During Mitosis. *J Cell Biol.* 2020 Mar 2;219(3):e201907087.
126. Hindriksen S, Bramer AJ, Truong MA et al. Baculoviral delivery of CRISPR/Cas9 facilitates efficient genome editing in human cells. *PLoS One.* 2017b; 12(6): e0179514.
127. Qian J, Beullens M, Lesage B and Bollen M. Aurora B defines its own chromosomal targeting by opposing the recruitment of the phosphatase scaffold Repo-Man. *Curr Biol.* 2013;23(12):1136-43.
128. Liang C, Chen Q, Yi Q et al. A kinase-dependent role for Haspin in antagonizing Wapl and protecting mitotic centromere cohesion. *EMBO Rep.* 2018;19(1):43-56.
129. Goto Y, Yamagishi Y, Shintomi-Kawamura M et al. Pds5 Regulates Sister-Chromatid Cohesion and Chromosome Bi-orientation through a Conserved Protein Interaction Module. *Curr Biol.* 2017;27(7):1005-1012.
130. Edgerton H, Johansson M, Keifenheim D et al. A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres during mitosis. *J Cell Biol.* 2016;213(6):651-64.
131. Yoshida MM, Ting L, Gygi SP and Azuma Y. SUMOylation of DNA topoisomerase II α regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis. *J Cell Biol.* 2016;213(6):665-78.
132. Yoshida MM and Azuma Y. Mechanisms behind Topoisomerase II SUMOylation in chromosome segregation. *Cell Cycle.* 2016;15(23):3151-3152.
133. Liang C Zhang Z, Chen Q et al. A positive feedback mechanism ensures proper assembly of the functional inner centromere during mitosis in human cells. *J Biol Chem.* 2019;294(5):1437-1450.
134. Zeitlin SG, Barber CM, Allis CD and Sullivan KF. Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 4):653-61.

135. Yi Q, Chen Q, Yan H et al. Aurora B kinase activity-dependent and -independent functions of the chromosomal passenger complex in regulating sister chromatid cohesion. *J Biol Chem.* 2019;294(6):2021-2035.
136. Ruppert JG, Samejima K, Platani M et al. HP1 α targets the chromosomal passenger complex for activation at heterochromatin before mitotic entry. *EMBO J.* 2018;37(6).
137. Javerzat JP. Heterochromatin and cohesion protection at human centromeres: the final say of a long controversy? *EMBO Rep.* 2018;19(4).
138. Asgar A, Lajeunesse A, Dulla K et al. Bub1 autophosphorylation feeds back to regulate kinetochore docking and promote localized substrate phosphorylation. *Nat Commun.* 2015;6:8364.
139. Baron AP, von Schubert C, Cubizolles F et al. Probing the catalytic functions of Bub1 kinase using the small molecule inhibitors BAY-320 and BAY-524. *eLife* 2016;5:e12187.
140. Shimada M, Goshima T, Matsuo H et al. Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. *Nature Communications.* 2018;7:12059.
141. Shimada M and Nakanishi M. Aurora B twists on histones for activation. *Cell Cycle.* 2016;15(24):3321-3322.
142. O'Connor A, Maffini S, Rainey MD et al. Requirement for PLK1 kinase activity in the maintenance of a robust spindle assembly checkpoint. *Biology Open.* 2016;5:11-19.
143. Meraldi P, Draviam VM and Sorger PK. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell.* 2004;7(1):45-60.
144. Kurihara D, Matsunaga S, Omura T et al. Identification and characterization of plant Haspin kinase as a histone H3 threonine kinase. *BMC Plant Biol.* 2011;11:73.
145. Kozgunova E, Suzuki T, Ito M et al. Haspin has Multiple Functions in the Plant Cell Division Regulatory Network. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(4):848-61.
146. Balboula AZ and Schindler K. Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004194.
147. Kang H, Park YS, Cho DH et al. Dynamics of histone H3 phosphorylation at threonine 3 during meiotic maturation in mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;458(2):280-6.
148. Wang Q et al. H3 Thr3 phosphorylation is crucial for meiotic resumption and anaphase onset in oocyte meiosis. *Cell Cycle.* 2016; 15(2): 213–224.

149. Balboula AZ, Nguyen AL, Gentilello AS et al. Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *J Cell Sci.* 2016; 129(19): 3648–3660.
150. Sha QQ, Dai XX, Jiang JC et al. CFP1 coordinates histone H3 lysine-4 trimethylation and meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Nat Commun.* 2018;9(1):3477.
151. Eddy EM. Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9(4):451-7.
152. De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction.* 2001;121(3):347-54.
153. Saiti D and Lacham-Kaplan O. Mouse germ cell development in-vivo and in-vitro. *Biomark Insights.* 2007; 2: 241–252.
154. Sasaki H and Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):129-40.
155. Sun YC, Wang YY, Ge W et al. Epigenetic regulation during the differentiation of stem cells to germ cells. *Oncotarget.* 2017;8(34):57836-57844.
156. Pui HP and Saga Y. Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling. *Mech Dev.* 2017;144(Pt B):125-139.
157. De Rooij DG. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. *Tissue Cell Kinetics.* 1973;(6):281-287.
158. Tegelenbosch RAJ and de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonia multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research.* 1993;290(2):193-200.
159. Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat.* 1956;99(3):391-413.
160. Oakberg EF. Duration of Spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.* 1956;99(3): 507-16.
161. Leblond CP and Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1952;55(4):548-73.
162. Ahmed EA and de Rooij DG. Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods Mol Biol.* 2009;558:263-77.
163. Meistrich ML and Hess RA. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods Mol Biol.* 2013;927:299-307.

164. Hess RA. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod.* 1990;43(3):525-42.
165. Hassold T and Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics.* 2001;2(4):280–291.
166. Marston AL and Amon A. Erratum: Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2004;5(12):983–997.
167. Kofman-Alfaro S and Chandley AC. Meiosis in the male mouse. An autoradiographic investigation. *Chromosoma.* 1970;31(4):404–420.
168. Petronczki M, Siomos MF and Nasmyth K. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell.* 2003;112(4):423-40.
169. Cahoon CK and Libuda DE. Leagues of their own: sexually dimorphic features of meiotic prophase I. *Chromosoma.* 2019;128(3):199-214.
170. Fawcett DW. The Fine Structure of Chromosomes in the Meiotic Prophase of Vertebrate Spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytology.* 1956;2(4):403-6.
171. Moses MJ. Chromosomal Structures in Crayfish Spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytology.* 1956;2(2):215-8.
172. Hernández-Hernández A, Ortiz Hernández R and Vázquez-Nin GH. Epigenetics of the Synaptonemal Complex. *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity.* 2014. <https://www.intechopen.com/books/meiosis-molecular-mechanisms-and-cytogenetic-diversity/epigenetics-of-the-synaptonemal-complex>.
173. Eijpe M, Offenberg H, Jessberger R et al. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol.* 2003;160(5):657-670.
174. Page J, de la Fuente R, Gómez R et al. Sex chromosomes, synapsis, and cohesins: a complex affair. *Chromosoma.* 2006;115(3):250-259.
175. Yang F, De La Fuente R, Leu NA et al. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol.* 2006;173(4):497-507.
176. Costa Y, Speed R, Ollinger R et al. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 12):2755-2762.
177. Hamer G, Gell K, Kouznetsova A et al. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt19):4025-4032.

178. Schramm S, Fraune J, Naumann R et al. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet.* 2011;7(5):e1002088.
179. Bolcun-Filas E and Schimenti JC. Genetics of meiosis and recombination in mice. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:179-227.
180. Cohen PE and Holloway JK. The Synaptonemal Complex and Synapsis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition), 2015.
181. Moens PB and Spyropoulos B. Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. *Chromosoma.* 1995;104(3):175-182.
182. Jordan PW, Karppinen J and Handel MA. Polo-like kinase is required for synaptonemal complex disassembly and phosphorylation in mouse spermatocytes. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 21):5061-5072.
183. Bisig CG, Guiraldelli MF, Kouznetsova A et al. Synaptonemal complex components persist at centromeres and are required for homologous centromere pairing in mouse spermatocytes. *PLoS Genet.* 2012;8(6):e1002701.
184. Cobb J, Miyaike M, Kikuchi A and Handel MA. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II alpha localization and chromosome condensation. *Chromosoma.* 1999;108(7):412-25.
185. Llano E, Gómez R, Gutiérrez-Caballero C et al. Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev.* 2008;22(17):2400-13.
186. Parra MT, Viera A, Gómez R et al. Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 6):961-74.
187. Parra MT, Gómez R, Viera A et al. Sequential assembly of centromeric proteins in male mouse meiosis. *PLoS Genet.* 2009;5(3):e1000417.
188. Weikert S, Schrader M, Müller M et al. Expression levels of the inhibitor of apoptosis survivin in testes of patients with normal spermatogenesis and spermatogenic failure. *Fertil Steril.* 2005;83 Suppl 1:1100-5.
189. Wang Y, Suominen JS, Hakovirta H et al. Survivin expression in rat testis is upregulated by stem-cell factor. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;218(1-2):165-74.
190. Tang CJ, Lin CY and Tang TK. Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol.* 2006;290(2):398-410.
191. Parra MT, Gómez R, Viera A et al. A perikinetochoric ring defined by MCAK and Aurora-B as a novel centromere domain. *PLoS Genet.* 2006;2(6):e84.

192. Rogers E, Bishop JD, Waddle JA et al. The aurora kinase AIR-2 functions in the release of chromosome cohesion in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *J Cell Biol.* 2002;157(2):219-29.
193. Kimmins S, Crosio C, Kotaja N et al. Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Mol Endocrinol.* 2007;21(3):726-39.
194. Revenkova E, Eijpe M, Heyting C et al. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol.* 2001;21(20):6984-98.
195. Maison C, Horstmann H and Georgatos SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol.* 1993;123(6 Pt 1):1491–505.
196. Meier J and Georgatos SD. Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO J.* 1994;13(8):1888–98.
197. Προεδρικό Διάταγμα 56/2013-ΦΕΚ 106/A/10-5-2013. Προσαρμογή της ελληνικής νομοθεσίας στην Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 (L 276/33/20.10.2010) «σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς». Τράπεζα Πληροφοριών Νομοθεσίας [Online]. <https://www.e-nomothesia.gr/kat-zoa-suntrophias-prostasia-zoon/pd-56-2013.html>.
198. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
199. Hasegawa K, Sin HS, Maezawa S et al. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H₂A ubiquitination. *Dev Cell.* 2015;32(5):574–588.
200. Monesi V. Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J Cell Biol.* 1962;14:1-18.
201. Khalil AM and Driscoll DJ. Epigenetic regulation of pericentromeric heterochromatin during mammalian meiosis. *Cytogenet. Genome Res.* 2010;129(4):280-9.
202. da Cruz I, Rodríguez-Casuriaga R, Santiñaque FF et al. Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage. *BMC Genomics.* 2016;17:294.
203. Luense LJ, Wang X, Schon SB et al. Comprehensive analysis of histone post-translational modifications in mouse and human male germ cells. *Epigenetics Chromatin.* 2016;9: 24.

204. Song N, Liu J, An S et al. Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis. *Acta Histochem Cytochem.* 2011;44(4):183-90.
205. El Zowalaty AE, Baumann C, Li R et al. Seipin deficiency increases chromocenter fragmentation and disrupts acrosome formation leading to male infertility. *Cell Death and Disease* (2015);6: e1817.
206. Federici F, Magaraki A, Wassenaar E et al. Round spermatid injection rescues female lethality of a paternally inherited Xist deletion in Mouse. *PLoS Genet.* 2016;12(10):e1006358.
207. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* 200;410(6824):120-4.
208. Lachner M, O'Carroll D, Rea S et al. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 2001;410(6824):116-20.
209. Watanabe S, Mishima Y, Shimizu M et al. Interactions of HP1 Bound to H3K9me3 Dinucleosome by Molecular Simulations and Biochemical Assays. *Biophys J.* 2018;114(10):2336-2351.
210. Brykczynska U, Hisano M, Erkek S et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(6):679-87.
211. Hammoud SS, Low DH, Yi C et al. Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and spermatogenesis. *Cell Stem Cell.* 2014;15(2):239-53.
212. Καράνικα ΕΒ. Επιγενετικοί ρυθμιστές και ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση: διακριτές λειτουργίες της Haspin κατά την διάρκεια της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. 2018. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Λειτουργικός - Κλινικοεργαστηριακός. Εργαστήριο Βιολογίας. <http://hdl.handle.net/10442/hedi/43978>.
213. Shimada M, Goshima T, Matsuo H et al. Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H₂AX-pS121 in mitosis. *Nature Communications.* 2016;7:12059.
214. Maezawa S, Hasegawa K, Yukawa M et al. Polycomb protein SCML2 facilitates H3K27me₃ to establish bivalent domains in the male germline. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(19):4957-4962.
215. Maezawa S, Hasegawa K, Alavattam KG et al. SCML2 promotes heterochromatin organization in late spermatogenesis. *J Cell Sci.* 2018; 131(17): jcs217125.
216. Hasegawa K, Sin HS, Maezawa S et al. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H₂A ubiquitination. *Dev Cell.* 2015;32(5):574-88.

217. Luo M, Zhou J, Leu NA et al. Polycomb protein SCML2 associates with USP7 and counteracts histone H2A ubiquitination in the XY chromatin during male meiosis. *PLoS Genet.* 2015;11(1):e1004954.
218. Karanika E, Soupsana K, Christogianni A et al. Haspin-dependent and independent effects of the kinase inhibitor 5-Iodotubercidin on self-renewal and differentiation. *Sci Rep.* 2020;10(1):232.
219. Xu X, Tan X, Lin Q et al. Mouse Dazl and its novel splice variant functions in translational repression of target mRNAs in embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1829(5):425-35.
220. Chen HH, Welling M, Bloch DB et al. DAZL Limits Pluripotency, Differentiation, and Apoptosis in Developing Primordial Germ Cells. *Stem Cell Reports.* 2014;3(5):892-904.
221. Hackett JA, Sengupta R, Zylicz JJ et al. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science.* 2013;339(6118):448-52.
222. Zagore LL, Sweet TJ, Hannigan MM et al. DAZL Regulates Germ Cell Survival through a Network of PolyA-Proximal mRNA Interactions. *Cell Rep.* 2018;25(5):1225-1240.e6.
223. Li M, Liu C, Zhu H et al. Expression pattern of Boule in dairy goat testis and its function in promoting the meiosis in male germline stem cells (mGSCs). *J Cell Biochem.* 2013;114(2):294-302.
224. Gatchalian J. Chromatin condensation and recruitment of PHD finger proteins to histone H3K4me3 are mutually exclusive. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(13):6102-12.
225. Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S et al. Histone seronylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature.* 2019;567:535–539.
226. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J and Zeller R. Cryosectioning tissues. *CSH Protoc.* 2008; 2008:pdb.prot4991.
227. Ventelä S, Toppari J and Parvinen M. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol Biol Cell.* 2003;14(7):2768-80.
228. Greenbaum MP, Yan W, Wu MH et al. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):4982-7.
229. Chakrabarti R, Kline D, Lu J et al. Analysis of Ppp1cc-null mice suggests a role for PP1gamma2 in sperm morphogenesis. *Biol Reprod.* 2007;76(6):992-1001.
230. Han Y, Haines CJ and Feng HL. Role(s) of Serine/Threonine Protein Phosphatase 1 on mammalian sperm motility. *Archives of Andrology.* 2007;53(4):169-77.

231. Sinha N, Pilder S and Vijayaraghavan S. Significant expression levels of transgenic PPP1CC2 in testis and sperm are required to overcome the male infertility phenotype of Ppp1cc null mice. *PLoS One*. 2012;7(10):e47623.
232. Nayernia K, Adham I, Kremling H et al. Stage and developmental specific gene expression during mammalian spermatogenesis. *Int J Dev Biol*. 1996;40(1):379-83.
233. Laiho A, Kotaja N, Gyenesi A and Sironen A. Transcriptome profiling of the murine testis during the first wave of spermatogenesis. *PLoS One*. 2013;8(4):e61558.
234. Hermann BP, Cheng K, Singh A et al. The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep*. 2018;25(6):1650-1667.e8.
235. Caperta AD, Rosa M, Delgado M et al. Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. *Cytogenet Genome Res*. 2008;122(1):73-9.
236. Varier RA, Outchkourov NS, de Graaf P et al. A phospho/methyl switch at histone H3 regulates TFIID association with mitotic chromosomes. *EMBO J*. 2010;29(23):3967–3978.
237. Hada M, Kim J, Inoue E et al. TH2A is phosphorylated at meiotic centromere by Haspin. TH2A is phosphorylated at meiotic centromere by Haspin. *Chromosoma*. 2017;126(6):769-780.
238. Abad MA, Ruppert JG, Buzuk L et al. Borealin-nucleosome interaction secures chromosome association of the chromosomal passenger complex. *J Cell Biol*. 2019. pii: jcb.201905040.
239. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M and Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S. (eds). *Andrology*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 11-59.
240. Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*. 2002;296(5576):2176-8.
241. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA et al. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev*. 2003;17(15):1870-81.
242. Lo WS, Trievel RC, Rojas JR et al. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*. 2000;5(6):917-26.
243. Metzger E, Yin N, Wissmann M et al. Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat Cell Biol*. 2008;10(1):53-60.

244. Metzger E, Imhof A, Patel D et al. Phosphorylation of histone H3T6 by PKC β (I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature*. 2010;464(7289):792-6.
245. Shimada M, Niida H, Zineldeen DH et al. Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell*. 2008;132(2):221-32.
246. Vastenhouw NL and Schier AF. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(3):374-86.
247. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL et al. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*. 2005;438(7071):1116-22.
248. Lesch BJ and Page DC. Poised chromatin in the mammalian germ line. *Development*. 2014;141(19):3619-26.
249. Kunowska N, Rotival M, Yu L et al. Identification of protein complexes that bind to histone H3 combinatorial modifications using super-SILAC and weighted correlation network analysis. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(3):1418-32.
250. McDowell TL, Gibbons RJ, Sutherland H et al. Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):13983-8.
251. Baumann C, Viveiros MM and De La Fuente R. Loss of maternal ATRX results in centromere instability and aneuploidy in the mammalian oocyte and pre-implantation embryo. *PLoS Genet*. 2010;6(9):e1001137.
252. Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM et al. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14075-80.
253. van de Werken C, van der Heijden GW, Eleveld C et al. Paternal heterochromatin formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone modifications. *Nat Commun*. 2014 Dec 18;5:5868.
254. Zhiteneva A, Bonfiglio JJ, Makarov A et al. Mitotic post-translational modifications of histones promote chromatin compaction in vitro. *Open Biol*. 2017;7(9). pii: 170076.
255. Dong F, Li Q, Yang C et al. PRMT2 links histone H3R8 asymmetric dimethylation to oncogenic activation and tumorigenesis of glioblastoma. *Nat Commun*. 2018;9(1):4552.
256. Noh KM, Wang H, Kim HR et al. Engineering of a histone-recognition domain in Dnmt3a alters the epigenetic landscape and phenotypic features of mouse ESCs. *Mol Cell*. 2015; 59(1): 89–103.
257. Shin J and Youn HD. Oct4 resetting by Aurkb-PP1 cell cycle axis determines the identity of mouse embryonic stem cells. *BMB Rep*. 2016;49(10):527-528.
258. Yoshimura Y, Tanaka H, Nozaki M et al. Nested genomic structure of haploid germ cell specific haspin gene. *Gene*. 2001;267(1):49-54.

259. Wolgemuth DJ and Watrin F. List of cloned mouse genes with unique expression patterns during spermatogenesis. *Mamm Genome*. 1991;1(4):283-8.
260. Nishimune Y and Tanaka H. Infertility caused by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes. *J Androl*. 2006;27(3):326-34.
261. Eddy EM, Toshimori K and O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*. 2003;61(1):103-15.
262. Fang X, Huang LL, Xu J et al. Proteomics and single-cell RNA analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in spermatogenesis. *Dev Biol*. 2019;454(2):118-127.
263. Lau YF, Li Y and Kido T. Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2009;87(1):114-22.
264. Navarro-Costa P, Plancha CE and Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:936569.
265. Kido T and Lau YF. Roles of the Y chromosome genes in human cancers. *Asian J Androl*. 2015;17(3):373-80.
266. Knauer-Fischer S, Besikoglu B, Inta I et al. Analyses of Gonadoblastoma Y (GBY)-locus and of Y centromere in Turner syndrome patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015;123(1):61-5.
267. Li Y, Zhang DJ, Qiu Y et al. The Y-located proto-oncogene TSPY exacerbates and its X-homologue TSPX inhibits transactivation functions of androgen receptor and its constitutively active variants. *Hum Mol Genet*. 2017;26(5):901-912.

